

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-514710

(P2015-514710A)

(43) 公表日 平成27年5月21日(2015.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y 4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-503326 (P2015-503326)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月25日 (2014. 11. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/032076
 (87) 国際公開番号 W02013/148315
 (87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/616, 241
 (32) 優先日 平成24年3月27日 (2012. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 アムラー, ルーカス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
 ジェネンテック, インコーポレイテッ
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER 3 阻害剤に関する診断及び治療

(57) 【要約】

本出願は、二重特異性HER 3 / EGFR阻害剤などのHER 3の阻害剤で癌患者を治療するための選択基準としてのNRG 1の過剰発現の利用、及びそれらの患者を治療する方法について記載する。

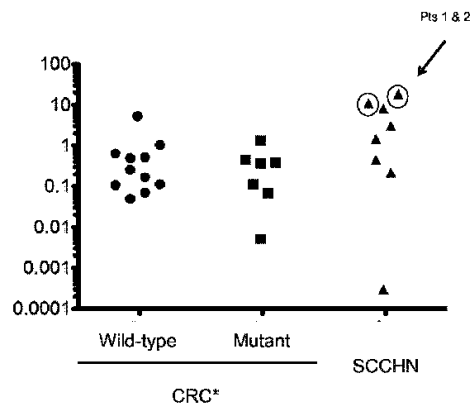


FIG. 16

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HER3 阻害剤の投与前にNRG1を過剰発現する癌と診断された患者に、HER3 阻害剤の治療的有効量を投与することを含む、ある種類の癌の患者を治療する方法。

【請求項 2】

前記患者が前記種類の癌におけるNRG1発現について、中央値のレベルよりも高いレベルでNRG1を発現する癌と診断された、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記患者が前記種類の癌におけるNRG1発現について、60パーセント以上以上のレベルでNRG1を発現する癌と診断された、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記患者が前記種類の癌におけるNRG1発現について、75パーセント以上以上のレベルでNRG1を発現する癌と診断された、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

前記患者が前記種類の癌におけるNRG1発現について、80パーセント以上以上のレベルでNRG1を発現する癌と診断された、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

癌の種類が、過剰発現モード及び過剰発現モードの欠如からなる二峰性の発現プロフィールを示す、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記癌の種類が、オートクリンニューレグリン誘導性のシグナル伝達を示す、請求項1から6までのいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記癌の種類が、頭頸部扁平上皮前記癌(HNSCC)である、請求項1から7までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記HER3阻害剤がHER3に結合するNRG1を阻害する、請求項1から8までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記HER3阻害剤が抗体である、請求項1から9までのいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記HER3阻害剤が二重特異性HER3/EGFR阻害剤である、請求項1から10までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

前記二重特異性HER3/EGFR阻害剤が、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

HER3及びEGFRに特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、

LSGDWIH(配列番号:3)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H1、

VGEISAAAGGYTD(配列番号:4)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H

40

2、

ARESRSVSFEAAMDY(配列番号:5)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H3、

及び

NIATDVA(配列番号:6)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L1、

SASF(配列番号:7)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L2、及び

SEPEPYT(配列番号:8)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L3

を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

特異的にHER3及びEGFRに結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号:1のア

50

ミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

特異的にHER3及びEGFRに結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号：1の重鎖可変ドメイン及び配列番号：2の軽鎖可変ドメインを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

診断が、患者の癌サンプル中のNRG1の発現レベルを測定し、前記サンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の発現レベルと比較して、前記サンプル中のNRG1の発現レベルを定量することからなる、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項17】

患者が、二重特異性HER3/EGFR阻害剤の投与前に、NRG1を過剰発現する頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)と診断された、前記患者に二重特異性HER3/EGFR阻害剤の治療的有効量を投与することを含む、HNSCC患者を治療する方法。

【請求項18】

二重特異性HER3/EGFR阻害剤が特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

HER3及びEGFRに特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、
 LSGDWIH(配列番号：3)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H1、
 VGEISAAAGGYTD(配列番号：4)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H2、及び
 ARESRVSFEAAMDY(配列番号：5)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H3、
 及び
 NIATDVA(配列番号：6)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L1、
 SASF(配列番号：7)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L2、及び
 SEPEPYT(配列番号：8)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L3
 を含む、請求項17に記載の方法。

20

30

【請求項20】

特異的にHER3及びEGFRに結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号：1のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

特異的にHER3及びEGFRに結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列及び配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項22】

前記診断が、患者のHNSCCのサンプル中のNRG1の発現レベルを決定することと、サンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の発現レベルと比較して、サンプル中のNRG1の発現レベルを定量することを含む、請求項17から21までのいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項23】

患者の癌サンプル中のニューレグリン1(NRG1)の発現を決定することと、癌サンプルがNRG1を過剰発現している場合に、治療にHER3阻害剤を選択することを含む、オートクリンニューレグリン誘導性のシグナル伝達を示す種類の癌を有する患者に対する治療を選択するための方法。

【請求項24】

50

前記癌サンプルが、前記種類の癌においてNRG1発現の中央値のレベルよりも高いレベルでNRG1を発現する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記癌サンプルが、前記種類の癌におけるNRG1発現について60パーセント以上のレベルでNRG1を発現する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記癌サンプルが、前記種類の癌におけるNRG1発現について75パーセント以上のレベルでNRG1を発現する、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

前記癌サンプルが、前記種類の癌におけるNRG1発現について80パーセント以上のレベルでNRG1を発現する、請求項24に記載の方法。

10

【請求項28】

前記種類の癌が、過剰発現モード及び過剰発現モードの欠如からなる二峰性の発現プロフィールを示す、請求項23に記載の方法。

【請求項29】

前記種類の癌が、頭頸部扁平上皮前記癌(HNSCC)である、請求項23から28までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記HER3阻害剤が、HER3に結合するNRG1を阻害する、請求項23から請求項29のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項31】

前記HER3阻害剤が抗体である、請求項23から30までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記HER3阻害剤が二重特異性HER3/EGFR阻害剤である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記二重特異性HER3/EGFR阻害剤が、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインが、
 LSGDWIH(配列番号:3)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H1、
 VGEISAAAGGYTD(配列番号:4)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H2、及び
 ARESRVSFEEAMDY(配列番号:5)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-H3、
 及び
 NIATDVA(配列番号:6)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L1、
 SASF(配列番号:7)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L2、及び
 SEPEPYT(配列番号:8)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L3
 を含む、請求項33に記載の方法。

30

40

【請求項35】

特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインが、配列番号:1のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号:2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記二重特異性抗体が、配列番号:1の重鎖可変ドメイン配列及び配列番号:2の軽鎖可変ドメインを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項37】

50

NRG1発現が、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて決定されている、請求項23から36までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

前記PCRが、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

NRG1発現が、IHCを用いて決定されている、請求項23から36までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

前記HNSCCの前記サンプル中の前記NRG1発現を決定することが、前記サンプル中の前記NRG1の前記発現レベルを決定することと、前記サンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の前記発現レベルと比較して、前記サンプル中のNRG1の前記発現レベルを定量することを含む、請求項23から39までのいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項41】

更に、前記HER3阻害剤の治療的有効量を前記患者へ投与することを含む、請求項23から40までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

前記サンプル中の前記NRG1の発現レベルを決定すること、及び

前記サンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の前記発現レベルと比較して、前記サンプル中の前記NRG1の前記発現レベルを定量することを含む、癌のサンプル中のNRG1発現レベルを定量する方法。

20

【請求項43】

癌が、オートクリンニューレグリン誘導されるシグナルを示す、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記癌が、オートクリンニューレグリン誘導されるシグナルを示す、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

NRG1発現レベル並びにAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の前記発現レベルが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて決定される、請求項42から44までのいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項46】

前記PCRが、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

NRG1の前記発現レベル並びにAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の前記発現レベルが、免疫組織化学（IHC）を用いて決定される、請求項42から44までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】

NRG1を過剰発現する種類の前記癌の治療に使用するためのHER3阻害剤。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、本明細書にその内容全体を参考として援用される2012年3月27日に出願された米国特許出願第61/616241号の優先権の利益を主張する。

【0002】

本出願は、癌治療及びHER3阻害剤での治療のために癌患者を選択する方法の分野に関する。

50

【背景技術】

【0003】

レセプターチロシンキナーゼのHERファミリーは、細胞増殖、分化及び生存の重要な介在物質である。このレセプターファミリーは、上皮細胞増殖因子レセプター（EGFR、ErbB1、又はHER1）、HER2（ErbB2又はp185^{neu}）、HER3（ErbB3）及びHER4（ErbB4又はtyro2）を含む4つの別個のメンバーを包含する。

【0004】

HER経路を標的とする治療剤は、乳癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌及び膵臓癌のような疾患の治療に現在は使用されている。

【0005】

EGFRは6つの異なるリガンド；上皮増殖因子（EGF）；トランスフォーミング増殖因子アルファ（TGF- α ）、アンフィレグリン、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子（HB-EGF）、ベータセルリン及びエピレグリンにより結合される（Groenenら Growth Factors 11:235-257(1994)）。

【0006】

ニューレグリンは、Her3及びHer4受容体チロシンキナーゼに対するリガンドである。ニューレグリンファミリーの4つの既知のメンバーとしては、NRG1、NRG2、NRG3、及びNRG4がある（Falls, D. L., *Exp Cell Res*, 284:14-30 (2003)；Hirsch及びWu (2007). *Expert Reviews*, Vol. 7, 147-157)。NRG1転写物は、少なくとも15の異なるアイソフォームが生じる大規模な選択的スプライシングを受ける。すべての活性アイソフォームは活性に必要なEGF様ドメインを共有する（Holmes, W. E.ら、*Science*, 256:1205-1210 (1992)；Yarden, Y.及びPeles, E., *Biochemistry* 30: 3543-3550(1991)）。

【0007】

米国では昨年、約52,140例の頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）が新たな症例として診断され、11,460例がこの疾患で死亡したと推定されている（1）。HNSCCに対する根治的介入には、外科手術、放射線治療、及び化学放射線併用療法が含まれる。原発性HNSCCの全体的な5年相対生存率は約60%である。しかし、転移性疾患と診断された患者の5年相対生存率は、わずか35%である（2）。進行性HNSCC患者における予後不良は、この集団におけるより効果的な治療の必要性を明確に示している（3）。

【0008】

上皮増殖因子受容体（EGFR）経路を介したシグナル伝達は、HNSCCの主要なドライバーである（4）。EGFRは、全てのHNSCCで最大90%が過剰発現されている（5, 6）。セツキシマブによるEGFR阻害は、内因性耐性又は獲得耐性により、長期臨床ベネフィットが幾分制限されているにもかかわらず、効果的な治療戦略であることが証明された（7）。EGFR及び/又はHER2を標的とするエルロチニブ、ゲフィチニブ、及びラパチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）は、HNSCCの臨床試験において研究されているが、無作為化試験では延命効果が実証されていない（8-10）。

【0009】

NRG1オートクリンシグナル伝達は、肺上皮細胞増殖を調節し（Jinboら、*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27:306-313 (2002)）、ヒト肺の発達において役割を果たすことが示されており（Patelら、*Am. J. Resp Cell Mol Bio*, 22: 432-440 (2000)）、EGFR阻害剤に対するNSCLCの感受性に関与している（Zhouら、*Cancer cell* 10:39-50 (2006)）。オートクリンシグナル伝達ループの中でNRG1がHER2キナーゼと結合することにより悪性腫瘍を促進しているが、特定の癌細胞株は、オートクリンシグナル伝達ループによって駆動されることが前臨床試験で示唆された。（Wilsonら、*Cancer Cell*, 20:158-173(2011)）。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0010】

一つの局面において、本発明は、HER3阻害剤の投与前に、NRG1を過剰発現する癌と診断された患者にHER3阻害剤の治療的有効量を投与することを含む、ある種類の癌の患者を治療する方法を提供する。NRG1の過剰発現は、HER3阻害剤に対する被験者の治療応答の指標である。一実施態様において、患者は、この種類の癌におけるNRG1発現が中央値のレベルよりも高いレベルでNRG1を発現する癌と診断された。特定の実施態様において、患者は、この種類の癌におけるNRG1発現について、60パーセント以上、75パーセント以上、又は80パーセント以上のレベルでNRG1を発現する癌と診断された。一実施態様において、癌の種類は、過剰発現モード及び過剰発現モードの欠如からなる二峰性の発現プロフィールを示す。一実施態様において、線形目盛で測定した二峰性の発現プロフィールの変曲点は1.5である。一実施態様において、癌の種類は、HNSCCのように、ニューレグリン誘導性のオートクリンシグナル伝達を示すものである。

10

【0011】

一実施態様において、HER3阻害剤はHER3に結合するNRG1を阻害する。一実施態様において、HER3阻害剤は抗体である。一実施態様において、HER3阻害剤は、二重特異性HER3/EGFR阻害剤である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列のHVR配列及び配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列のHVR配列を含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列及び配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0012】

一実施態様において、診断は患者の癌のサンプル中のNRG1発現レベルを決定すること、及びサンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の発現レベルと比較して、サンプル中のNRG1の発現レベルを定量することを包含した。

【0013】

別の局面において、本発明は、患者への二重特異性HER3/EGFR阻害剤の治療的有効量を投与することを含む、患者の頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を治療する方法であって、患者が、二重特異性HER3/EGFR阻害剤の投与前にNRG1を過剰発現するHNSCCと診断されている方法を提供する。NRG1の過剰発現は、二重特異性HER3/EGFR阻害剤に対する被験者の治療応答の指標である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列のHVR配列、及び配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列のHVR配列を含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列番号：1の重鎖可変ドメイン及び配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0014】

別の局面において、本発明は、ニューレグリン誘導性のオートクリンシグナル伝達を示す種類の癌の患者のための治療法であって、患者の癌サンプル中のニューレグリン1(NRG1)の発現を決定することと、癌サンプルが、NRG1を過剰発現した場合に、治療にHER3阻害剤を選択することを含む方法を提供する。一実施態様において、癌サンプルは、この種類の癌におけるNRG1発現について、中央値のレベルよりも高いレベルでNRG1を発現する。特定の実施態様では、癌サンプルは、この種類の癌におけるNRG1発現について、60パーセント以上、75パーセント以上、80パーセント以上のレベルでNRG1を発現する。一実施態様において、癌の種類は、過剰発現モード及び過剰発現モードの欠如からなる二峰性の発現プロフィールを示すものである。一実施態様において、線形目盛で測定した二峰性の発現プロフィールの変曲点は1.5である。一実施態様において、癌の種類は、HNSCCのように、オートクリンニューレグリン

40

50

誘導性のシグナル伝達を示すものである。一実施態様において、方法は更に、患者へのHER3阻害剤の治療的有効量を投与することを含む。一実施態様において、癌の種類はHNSCCである。一実施態様において、HER3阻害剤はHER3に結合するNRGを阻害する。一実施態様において、HER3阻害剤は抗体である。一実施態様において、HER3阻害剤は、二重特異性HER3/EGFR阻害剤である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列のHVR配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列のHVR配列を含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0015】

一実施態様において、NRG1発現の決定は、患者の癌のサンプル中のNRG1の発現レベルを決定し、サンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の発現レベルと比較して、サンプル中NRG1の発現レベルを定量することを含む。

【0016】

別の局面において、本発明は、患者のHNSCCサンプル中のニューレグリン1(NRG1)の発現を決定し、HNSCCサンプルがNRG1を過剰発現した場合には、療法として二重特異HER3/EGFR阻害剤を選択することを含む、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)患者のための治療を選択するための方法を提供する。一実施態様において、患者への二重特異性HER3/EGFR阻害剤の治療的有効量を投与することを更に含む。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列のHVR配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列のHVR配列を含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む。一実施態様において、NRG1発現の決定は、患者の癌由来のサンプル中のNRG1の発現レベルを測定し、サンプル中のAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の発現レベルと比較して、試料中のNRG1の発現レベルを定量することを含む。

20

30

【0017】

本発明の別の局面は、HER3阻害剤又はその薬学的に受容可能な組成物を宣伝するための方法であって、ターゲット層(target audience)に対して、患者の癌がNRG1を過剰発現する種類の癌を有する患者集団を治療するためのHER3阻害剤又はその薬学的組成物の使用を奨励することを包含する方法を提供する。一実施態様において、HER3阻害剤はHER3に結合するNRGを阻害する。一実施態様において、HER3阻害剤は抗体である。一実施態様において、HER3阻害剤は、二重特異性HER3/EGFR阻害剤である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列のHVR配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列のHVR配列を含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0018】

本発明の別の局面は、二重特異性HER3/EGFR阻害剤又はその薬学的に受容可能な組成物を宣伝するための方法であって、ターゲット層(target audience)に対して、患者のHNSCCがNRG1を過剰発現するHNSCCを有する患者集団を治療するための二重特異性HER3/EGFR阻害剤又はその薬学的組成物の使用を奨励することを包含する方法を提供する。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特異的にHER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異

50

性抗体である。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメインのHVR配列、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列のHVR配列を含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列の配列番号：1の重鎖可変ドメイン、及び配列の配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【0019】

別の局面において、本発明は、サンプル中のNRG1の発現レベルを決定すること、及びサンプル中の内部標準の遺伝子(単数又は複数)の発現レベルと比較して、サンプル中のNRG1の発現レベルを定量することを含む、癌サンプル中のNRG1発現レベルを定量する方法を提供する。一実施態様において、参照遺伝子(単数又は複数)は、AL-137727及びVPS33Bの一方又は両方である。一実施態様において、サンプルは、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)などのオートクリニューレグリン誘導性のシグナル伝達を示す癌由来のものである。この方法の特定の一実施態様において、NRG1の発現レベル、並びにAL-137727及びVPS33Bの一方又は両方の発現レベルはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して決定される。一実施態様では、本方法において使用されるPCRは、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)である。別の実施態様において、NRG1の発現レベルは、免疫組織化学(IHC)又はELISAを用いて決定される。別の実施態様において、NRG1の発現レベルは、免疫組織化学(IHC)又はELISAを用いて決定される。別の実施態様において、NRG1の発現レベルは、直接的RNA塩基配列決定法によって決定される。別の実施態様において、NRG1の発現レベルは、RNAインサイツハイブリダイゼーションを用いて決定される。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0020】

図1は、MEHD7945A抗体がHER3-ECD及びEGFR-ECDの両方に結合することを示すグラフである。

図2A及び図2Bは、MEHD7945AがEGFR及びHER2/HER3依存性のシグナル伝達を阻害することを実証するグラフである。

図3は、MEHD7945AによるFadu癌モデルにおける腫瘍増殖の阻害を示すグラフである。

図4は、多数のマウス異種移植モデルにおけるセツキシマブ又は抗HER3と比較したMEHD7945Aの腫瘍増殖抑制効果をまとめたものである。

30

図5は、定量RT-PCRにより決定される、この種類の癌におけるNRG1(A)及びHER3(B)発現レベルを示している。

図6は、他の種類の癌と比較した、HNSCCにおけるNRG1発現の二峰性の分布を示している。

図7は、常用対数目盛でプロットした場合の、HNSCCにおけるNRG1発現の二峰性の分布を示している。点線は、HNSCCにおけるNRG1発現の過剰発現及び過剰発現モードの欠如との間の変曲点を示しており、それは、対数目盛で0.3689に設定され、線形目盛での約1.50に相当する。

図8は、治療未経験のSCHNN患者の新鮮凍結腫瘍標本におけるpHER3及びのpTyrのIP-ウェスタンプロット分析の結果を示している。MCF7はネガティブコントロールである。MCF7+NRG及びPCI6Aはポジティブコントロールである。pHER3のコントロールが同時に実行されたのに対して、pTyrプロットのコントロールは個別に実行された。

40

図9は、23例のSCHNN腫瘍(IP-ウェスタンで19例中18例のオーバーラップ)において、高いNRG1発現がHER3シグナリングのpHER3差動活性化と関連していることを示唆する、定量RT-PCRアッセイの結果を示している。x軸の下の黒い線は、IP-ウェスタンで検出可能なpHER3を有する腫瘍を示している。

図10は、分析に用いた患者及びその腫瘍の病理学的及び人口統計学的変数を表に要約したものである。

図11は、適合しない原発性及び再発性のHNSCC標本において、NRG1発現のレ

50

ベルを比較する定量 R T - P C R 分析を示している。

図 1 2 は、適合した原発性及び再発性の H N S C C において、N R G 1 発現のレベルを比較する定量 R T - P C R 分析を示している。

図 1 3 は、適合した治療未経験及び治療後の H N S C C s との間の比較を示している表である。

図 1 4 は、N R G 1 又は H E R 3 発現及び適合した治療未経験と化学療法後の H N S C C サンプルとの間のオートクリン生物学の変化を示している表である。対比染色した核内の N R G 1 又は H E R 3 もしくは両方の転写産物の発現の検出には、D e f i n i e n s 社のソフトウェアを使用した。

図 1 5 は、原発性及び再発性 S C H N N s における、R N A - I S H 及び N R G 1 の定量 R T - P C R (A) 及び H E R 3 (B) のペアごとの分析を示す。スピアマンの順位相関及び p 値をグラフ上に示す。

図 1 6 は、H N S C C 及び C R C 患者の N R G 1 発現レベルを示している。

図 1 7 は、第 I 相試験における H N S C C 患者の N R G 1 発現レベルと比較した、原発性及び再発性 H N S C C における N R G 1 発現レベルを示している。

図 1 8 は、抗体 M E H D 7 9 4 5 A (配列番号 : 1 及び配列番号 : 2) のアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 1 】

I . 定義

他に定義されていない限り、ここで使用される全ての技術専門用語、表記及び他の科学的用語は、この発明に関連する当業者に共通して理解される意味を持つものである。幾つかの場合には、共通して理解される意味を持つ用語を明確化のため及び / 又は参照を容易にするために、本明細書で定義するが、ここにそのような定義を含めることが、当該分野で一般的に理解されることに対して実質的な差異を表すものと必ずしも解釈されるものではない。本明細書に記載され、又は参照される技術及び手順は一般的に十分理解されるものであり、例えば Sambrook ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載の広く利用される分子クローニング方法論などの、当業者による一般的な方法論を用いて通常行われるものである。適切ならば、市販のキットや試薬の使用を伴う手順は、特に明記しない限り、製造者が定めたプロトコール及び / 又はパラメーターに従って一般的に実施される。

【 0 0 2 2 】

したがって、本方法、キット及び用途に記載する前に、本発明が、記載されたような特定の方法論、プロトコール、細胞株、動物の種又は属、コンストラクト、及び試薬に限定されず、当然変わりうるものが理解されなければならない。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施態様を記載する目的のためだけのものであり、本発明の範囲を限定する意図はなく、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されなければならない。

【 0 0 2 3 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「 a 」、「 a n d 」、及び「 t h e 」は、文脈が明らかに他の定義を意味しないならば、複数の指示対象も含む。

【 0 0 2 4 】

本明細書及び特許請求の範囲を通して、「 c o m p r i s e 」なる語、又は「 c o m p r i s e s 」又は「 c o m p r i s i n g 」等の変形語は、記載された整数又は整数群を含むことを意味するが、如何なる他の整数又は整数群も除外するものではないことが理解されるであろう。

【 0 0 2 5 】

本明細書中の「抗体」は最も広義に用いられ、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体から形成される多特異性抗体 (例えば二重特異性抗体)、及び所望の生物学的活性を表す限りにおける抗体断片を包含する。「多重特異性抗体」なる用語は最も広義

10

20

30

40

50

に用いられ、ポリエピトープ性特異性を有する抗体を具体的に網羅する。(即ち、一つの生体分子上の二つ以上の異なるエピトープに特異的に結合することが可能であるか、又は二つ以上の異なる生体分子上のエピトープに特異的に結合することが可能である。)抗原結合ドメインの一例は、重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)からなるVHVLユニットである。このような多重特異性抗体は、完全長抗体、二以上のVL及びVHドメインを有する抗原、Fab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ(diabodies)、二重特異性ダイアボディ及びトライアボディ(triabodies)、共有結合又は非共有結合した抗体断片を含むが、これらに限定されない。「二重特異性抗体」は、一つの生物学的分子にある二つの異なるエピトープに特異的に結合できるか、又は二つの異なる生物学的分子にあるエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを含む多重特異性抗体である。二重特異性抗体はまた「二重特異性」を有するか、又は「二重特異的」であるとも称される。

10

【0026】

ある実施態様では、本発明の抗体は、その標的HER又はHERsに対して $1\mu\text{M}$ 、 100nM 、 10nM 、 1nM 、 0.1nM 、 0.01nM 、又は 0.001nM (例えば、 10^{-8}M 以下、例えば 10^{-8}M から 10^{-13}M 、例えば 10^{-9}M から 10^{-13}M)の解離定数(Kd)を有している。

【0027】

基本的な4-鎖抗体ユニットは二つの同一の軽(L)鎖と二つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれに付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は一つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、二つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。それぞれのH鎖は、及び鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(CH)が、 μ 及びアイソタイプに対しては4つのCHドメインが続く可変ドメイン(VH)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(CL)が続く可変ドメイン(VL)をN末端に有する。VLはVHと整列し、CLは重鎖の第一定常ドメイン(CH1)と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間のインターフェイスを形成すると考えられている。VLとVHは共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

20

30

【0028】

任意の脊椎動物種からの抗体のL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ及びラムダと呼ばれる明確に区別される二つのタイプのタイプを割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、抗体(免疫グロブリン)は、異なるクラスに割り当てることができる。5つのクラスの免疫グロブリンがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、それぞれ、及び μ と指定された重鎖を有する。及び α クラスは更にCH配列及び機能の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えばヒトでは、次のサブクラス: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を発現する。

40

【0029】

「可変」なる用語は、可変ドメインの所定のセグメントが抗体間で配列の点で広範囲に相違していることを意味する。Vドメインは抗原結合を媒介し、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を定める。しかしながら、可変性は可変ドメインの110アミノ酸のスパンにわたって均一に分布しているのではない。その代わりに、V領域は、「高頻度可

50

変領域」又はHVRと呼ばれる極度の可変性のより短い領域により分離した15～30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる相対的に不変の伸長部からなる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、主としてβ-シート立体構造をとり、3つの高頻度可変領域によって連結され、β-シート構造を連結し、場合によってはその一部を形成することもある4つのFRを含む。各鎖の高頻度可変領域はFRによって極く近傍に一緒に保持され、他の鎖からの高頻度可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照)。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係しないが、例えば抗体依存性細胞傷害性(ADCC)における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

10

【0030】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変であるか、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み；VHに3つ(HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)、VLに3つ(HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3)である。天然の抗体では、H3及びL3は6つのHVRのうちで最も高い多様性を示し、特にH3は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすと考えられている。例としてXuら Immunity 13:37-45(2000)；Johnson及びWu, Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)を参照。実際、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が無い状態で安定である。例えば、Hamers-Castermanら, Nature 363:446-448 (1993)；Sheriffら, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)を参照。

20

【0031】

HVRは、一般的に超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」(CDR)由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性であり、及び/又は抗原認識に参与している。多数のHVRの描写が使用され、ここに含まれる。Kabata相補性決定領域(CDR)であるHVRは配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbMHVRは、KabataのHVR及びChothiaの構造的ループの間の折衷を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」HVRは、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これらのHVRのそれぞれに由来する残基を以下に示す。

30

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Kabata 番号付け)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Chothia 番号付け)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

40

【0032】

HVRは、次のような「拡大HVR」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は47-65(H2)及び93

50

- 102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これらの各々を規定するために、上掲のKabatらに従って番号を付した。

【0033】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基である。

【0034】

「Kabatによる可変ドメイン残基番号付け」又は「Kabatに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、上掲のKabat等の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVRの短縮又はFR又はHVRへの挿入に対応する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)、及び重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82b及び82cなど)を含んでもよい。残基のKabat番号付けは、「標準の」カバット番号付け配列による抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

10

【0035】

可変ドメイン(およそ軽鎖の残基1-107及び重鎖の残基1-113)中の残基に言及するとき、Kabatの番号付けシステムが一般に使用される(例えばKabatら、Sequence of Immunological Interest. 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。免疫グロブリン重鎖定常領域中の残基に言及するとき、「EU番号付けシステム」又は「EUインデックス」が一般に使用される(例えば上掲のKabat等に報告されているEUインデックス)。「KabatにおけるようなEUインデックス」はヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを意味する。ここで別の定義を述べない限り、抗体の可変ドメイン内の残基番号の参照は、Kabat番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。ここで別の定義を述べない限り、抗体の定常ドメイン内の残基番号の参照は、EU番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する(例えば、国際公開第2006/073941号を参照)。

20

【0036】

「親和性」とは、分子(例えば、抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対(例えば、抗体と抗原)のメンバー間の1:1の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般的に解離定数(Kd)で表すことができる。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。

30

【0037】

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数のHVR又はフレームワーク領域において一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又は更にピコモルの親和性を有する。ヒト抗体は、当技術分野で周知の特定の手順を用いて生産されてよい。例えば、Marksら、Bio/Technology10:779-783(1992)は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。HVR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発については、例えば、Barbasら、Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schierら、Gene 169:147-155 (1995);

40

Yeltonら、J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jacksonら、J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkinsら、J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に記述されている。

【0038】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。

50

抗体には以下の5つの主要な分類がある：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M、及びこれらの幾つかは、更にサブクラス(アイソタイプ)、例えば、I g G₁、I g G₂に、I g G₃、I g G₄、I G A₁、及びI g A₂に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ と呼ばれる。

【0039】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、一般的に少量で存在している変異体のように、モノクローナル抗体の製造時に発生しうる可能な変異を除いて、集団を構成する個別の抗体は、実質的に同様であり、同じエピトープに結合する。このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合する可変領域を含む抗体を含み、この場合、抗体は複数の抗体からの抗体の選択を含むプロセスによって得られた。例えば、この選択プロセスは、雑種細胞クローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択とすることができる。選択された抗体は、例えば標的への親和性の向上、抗体のヒト化、細胞培養液中におけるその産生の向上、インビボでの免疫原性の低減、多選択性抗体の生成等のために更に変化させることができ、変化させた可変領域配列を含む抗体もまた、本発明のモノクローナル抗体である。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらが他の免疫グロブリンで通常汚染されていないという点で有利である。「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないと解釈されるべきものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler及びMilstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongoら, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995); Harlowら, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2版 1988); Hammerlingら: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clacksonら, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marksら, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhuら, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Leeら, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及びLeeら, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の一部又は全部、又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術(例えば、国際公開第1998/24893号; 国際公開第1996/34096号; 国際公開第1996/33735号; 国際公開第1991/10741号; Jakobovitsら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovitsら, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemannら, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 米国特許第5545807号; 同第5545806号; 同第5569825号; 同第5625126号; 同第5633425号; 同第5661016号; Marksら, *Bio.Technology* 10: 779-783 (1992); Lonbergら, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwildら, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)及びLonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。

【0040】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位並びにC L及び少なくとも重鎖定常ドメインC H₁、C H₂及びC H₃を含む。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体でありうる。好ましくは、インタクトな抗体は、一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0041】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例としては、F V、F a b、F a b'、F(F a b')₂、F

10

20

30

40

50

a b'-S H ; ダイアボディ ; 直鎖抗体 (米国特許第 5 6 4 1 8 7 0 号、実施例 2 ; Zapata ら, Protein Eng. 8 (10) : 1057-1062[1995] を参照) ; 単鎖抗体分子 (例えば、s c F v) を含む。本発明において、明細書の全体を通じて、抗体及び抗体の種々の特性に対して参照がなされ、同じ開示が機能的抗体断片、例えば二重作用 F a b 断片にも当てはまる。

【 0 0 4 2 】

「線状抗体」との表現は、Zapata ら、Protein Eng, 8(10):1057-1062(1995)に記載の抗体を一般に意味する。これらの抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと共に一对の抗原結合領域を形成する一对の直列の F d セグメント (V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1) を含む。好ましい実施態様では、断片は「機能的」である、つまり標的 H E R レセプターに結合する対応するインタクトな抗体の能力を定性的に保持し、インタクトな抗体は H E R 活性化又は機能をまた阻害するならば、そのような疎外特性をまた定性的に保持する。定性的な保持とは、同じ種の活性が保持されるが、結合親和性及び / 又は活性の度合いは異なるかも知れないことを意味する。

10

【 0 0 4 3 】

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一な抗原結合断片、及び残りの「F c」断片 (名称は容易に結晶化する能力を反映している) を生成する。F a b 断片は、H鎖の可変領域ドメイン (V_H) と一緒のL鎖の全体、及び一方の重鎖の第一の定常ドメイン (C_H 1) からなる。抗体のペプシン処理は、二価の抗原結合活性を有し、かつ抗原に尚も架橋可能である、2つのジスルフィド結合型 F a b 断片に大まかに相当する単一の大きな F (a b ')₂ 断片を生じる。F a b '断片は、抗体ヒンジ領域からの一以上のシステインを含む C_H 1 ドメインのカルボキシル末端で付加的な 2 ~ 3 の残基を有する点が F a b 断片とは異なる。F a b '-S H は、本明細書において、F a b 'の名称であり、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ。F (a b ')₂ 抗体断片は、間にヒンジシステインを有する F a b '断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。抗体断片の他の化学結合も知られている。

20

【 0 0 4 4 】

F c 断片は、ジスルフィドにより一緒に保持される、両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c 領域における配列によって決定され、この領域はまた、特定の種類の細胞に見出される F c レセプター (F c R) によって認識される部分である。

30

【 0 0 4 5 】

「F v」は1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域ドメインが、堅固な非共有結合をなした二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ (H 及び L 鎖から、それぞれ3つのループ) が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン (又は抗原に対して特異的な3つの H V R のみを含む F v の半分) でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【 0 0 4 6 】

「s F v」又は「s c F v」とも略称される「単鎖 F v」は、単一のポリペプチド鎖内に結合した V_H 及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s F v ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは s F v が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s F v の総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269315 (1994) ; Borrebaeck 1995 を参照。

40

【 0 0 4 7 】

用語「ダイアボディ (diabodies)」は、鎖間ではなく鎖内で V ドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、V_H と V_L ドメインとの間に、短いリンカー (約 5 - 1 0 残基) を持つ s F v 断片 (前の段落を参照) を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。ダイアボディ

50

は、例えば、欧州特許第404097号；国際公開93/11161号；及びHollingerら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により完全に記載されている。

【0048】

参照抗体として「同一のエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて50%以上、参照抗体のその抗原への結合をブロックする抗体、逆に競合アッセイにおいて50%以上、その抗体のその抗原への結合をブロックするその参照抗体を指す。

【0049】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び/又は軽鎖の残りが異なる起源又は種から由来する抗体を指す。

【0050】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【0051】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_Hフレームワーク配列の選別において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列のサブグループは、Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3におけるサブグループである。一実施態様では、V_Lについて、サブグループは上掲のKabatらにおけるサブグループカッパIである。一実施態様では、V_Hについて、サブグループは上掲のKabatらにおけるサブグループIIIである。

【0052】

非ヒト（例えば齧歯類）抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から生じる最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の抗体特異性、親和性、及び性能を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などのヒト以外の種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。幾つかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体にも見出されない残基を含みうる。これらの修飾は、抗体の性能を更に改良するために作成される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、超可変ループの全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリンの定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含むであろう。更なる詳細については、Jonesら，Nature, 321:522-525(1986)；Riechmannら，Nature, 332:323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)を参照。

【0053】

対象の抗原に「結合する」この発明の抗体は、当該抗原を発現する細胞又は組織を標的とする上で、抗体が診断及び/又は治療剤として有用であるように十分な親和性をもって抗原に結合するものである。標的分子への抗体の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープ「（に対する）特異的結合」、「に特異的に結合する」又は「に特異的である」という用語は、非特異的相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、コントロール分子の結合と比較したある分子の結合を決定することにより測定することができる。例えば、特異的結合は、標的と類似のコントロール分子との競合、例えば、過剰の非標識標的により定量することができる。この場合、標識した標的のプロープに対する結合が、過剰の非標識標的により競合的に阻害されると、特異的結合が示される。特定の一実施態様では、「特異的に結合する」は、他の

10

20

30

40

50

特定された非標的HERレセプターではなくその特定された標的HERレセプターへの抗体の結合を意味する。例えば、抗体はEGFR及びHER3に特異的に結合するが、HER2又はHER4に特異的には結合せず、又は抗体はEGFR及びHER2に特異的に結合するが、HER3又はHER4に特異的には結合せず、又は抗体はEGFR及びHER4に特異的に結合するが、HER2又はHER3に特異的には結合しない。

【0054】

「HERレセプター」は、HERレセプターファミリーに属し、EGFR (ErbB1, HER1)、HER2 (ErbB2)、HER3 (ErbB3) 及びHER4 (ErbB4) レセプターを含むレセプタータンパク質チロシンキナーゼである。HERレセプターは、HERリガンドと結合し、かつ/又は別のHERレセプター分子と二量体化できる細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；及びリン酸化されうる幾つかのチロシン残基を保有するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを一般に含むものである。HERレセプターは、「天然配列」HERレセプター又はその「アミノ酸配列変異体」でありうる。好ましくは、HERレセプターは天然配列のヒトHERレセプターである。

10

【0055】

「HER経路」はHERレセプターファミリーによって媒介されるシグナル伝達ネットワークを意味する。

【0056】

「ErbB1」、「HER1」「上皮増殖因子レセプター」及び「EGFR」という用語は、ここでは互換的に使用され、例えばCarpenterら, Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987)に開示されているEGFRを意味し、その天然に生じる突然変異体(例えば、Ulrichら, Nature (1984) 309:418425 及びHumphreyら, PNAS(USA) 87:4207-4211(1990)に記載されているような欠失変異体EGFR)、並びにその変異体、例えばEGFRvIIIを含む。EGFRの変異体はまた欠失、置換及び挿入変異体、例えばLynchら(New England Journal of Medicine 2004, 350:2129)、Paezら(Science 2004, 304:1497)、及びPaoら(NAS 2004, 101:13306)に記載されているものを含む。

20

【0057】

本明細書では、「EGFR細胞外ドメイン」又は「EGFR ECD」は、細胞の外にあるEGFRのドメインを意味し、細胞膜に固定されるかもしくは循環し、その断片を含む。一実施態様では、EGFRの細胞外ドメインは4つのドメイン：「ドメインI」(約1-158からのアミノ酸残基)、「ドメインII」(アミノ酸残基159-336)、「ドメインIII」(アミノ酸残基337-470)、及び「ドメインIV」(アミノ酸残基471-645)を含み得、ここで、境界はおおよそであり、約1-3のアミノ酸だけ変わりうる。

30

【0058】

「ErbB2」及び「HER2」なる表現は、ここで互換的に使用され、例えばSembaら, PNAS(USA)82:6497-501(1985)及びYamamotoら, Nature 319:230-234(1986)(Genebank受託番号X03363)に記載されているヒトHER2タンパク質を意味する。「erbB2」という用語は、HER2をコードする遺伝子を意味し、「neu」はラットp185^{neu}をコードする遺伝子を意味する。好ましくは、HER2は天然配列ヒトHER2である。

40

【0059】

本明細書では、「HER2細胞外ドメイン」又は「HER2 ECD」は、細胞の外にあるHER2のドメインを意味し、細胞膜に固定されるかもしくは循環し、その断片を含む。一実施態様では、HER2の細胞外ドメインは4つのドメイン：「ドメインI」(約1-195からのアミノ酸残基)、「ドメインII」(約196-319からのアミノ酸残基)、「ドメインIII」(約320-488からのアミノ酸残基)、及び「ドメインIV」(約489-630からのアミノ酸残基)(シグナルペプチドを除く残基番号付け)を含みうる。Garrettら, Mol. Cell. 11:495-505 (2003)、Choら, Nature 421:756-760

50

(2003)、Franklinら、Cancer Cell 5:317-328 (2004)、及びPlowmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993)を参照されたい。

【 0 0 6 0 】

「 E R r B 3 」及び「 H E R 3 」は、例えば米国特許第 5 1 8 3 8 8 4 号及び第 5 4 8 0 9 6 8 号並びにKraus ら PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)に開示されているレセプターポリペプチドを意味する。

【 0 0 6 1 】

本明細書で、「 H E R 3 細胞外ドメイン」又は「 H E R 3 E C D 」は、細胞の外にある H E R 3 の細胞外ドメインを意味し、細胞膜に固定されるかもしくは循環し、その断片を含む。一実施態様では、 H E R 3 の細胞外ドメインは4つのドメイン：ドメイン I、ドメイン II、ドメイン III、及びドメイン IV を含む。一実施態様では、 H E R 3 E C D はアミノ酸 1 - 6 3 6 を含む（シグナルペプチドを含む番号付け）。一実施態様では、 H E R 3 ドメイン III はアミノ酸 3 2 8 - 5 3 2 を含む（シグナルペプチドを含む番号付け）。

【 0 0 6 2 】

本明細書での「 E r b B 4 」及び「 H E R 4 」なる用語は、例えば、欧州特許出願公開第 5 9 9 2 7 4 号；Plowmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750(1993)；及びPlowmanら、Nature 366:473-475(1993)に開示されたレセプターポリペプチドを意味し、例えば 1 9 9 9 年 4 月 2 2 日公開の国際公開第 9 9 / 1 9 4 8 8 号に開示されているそのアイソフォームを含む。

【 0 0 6 3 】

「 H E R リガンド」とは、 H E R レセプターに結合する及び/又は活性化するポリペプチドを意味する。本明細書で特に対象とする H E R リガンドは、例えば上皮細胞増殖因子（ E G F ）（Savageら、J. Biol. Chem. 247: 7612-76721(1972)）；トランスフォーミング増殖因子 - （ T G F - ）（Marquardtら、Science 223: 1079-1082 (1984)）；シュワン細胞腫由来増殖因子又はケラチノサイトオートクリン増殖因子としても知られているアンフィレグリン（Shoyabら、Science 243:1074-1076(1989)；Kimuraら、Nature 348:257-260(1990)）；及びCookら、Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557(1991)）；ベータセルリン（Shingら、Science259:1604-1607(1993)）；及びSasadaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173(1993)）；ヘパリン結合上皮細胞増殖因子（ H B - E G F ）（Higashiyamaら、Science 251:936-939(1991)）；エピレグリン（Toyodaら、J. Biol. Chem. 270: 7495-7500(1995)）；及びKomurasakiら、Oncogene 15:2841-2848(1997)）；ヘレグリン（以下参照）；ニューレグリン - 2 （ N R G - 2 ）（Carrawayら、Nature 387: 512-516(1997)）；ニューレグリン - 3 （ N R G - 3 ）（Zhangら、Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 9562-9567(1997)）；及びニューレグリン - 4 （ N R G - 4 ）（Harariら Oncogene 18:2681-89(1999)）又はクリプト（ C R - 1 ）（Kannanら J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335(1997)）のような天然配列ヒト H E R リガンドである。 E G F R に結合する H E R リガンドは、 E G F、 T G F - 、アンフィレグリン、ベータセルリン、 H B - E G F 及びエピレグリンを含む。 H E R 3 に結合する H E R リガンドは、ヘレグリンを含む。 H E R 4 に結合する能力のある H E R リガンドはベータセルリン、エピレグリン、 H B - E G F、 N R G - 2、 N R G - 3、 N R G - 4 及びヘレグリンを含む。

【 0 0 6 4 】

用語「 N R G 」は、本明細書において、特に断りのない限り、霊長類（例えばヒト）及び齧歯動物（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の（ヘレグリン（ H R G ）としても知られる）任意の天然のニューレグリンを指す。用語は、天然プロセッシングから生じる N R G の任意のフォームのみならず、「完全長」の、未処理の N R G を包含する。用語はまた、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体などの天然に存在する N R G の変異体を包含する。 N R G には、既知の 4 つの形式がある。 N R G 1 （Holmes, W.E. ら、Science 256:1205-1210 (1992)）； N R G 2 (Caraway, K.L. ら、Nature 387:512-516 (1997)）； N R G 3 （Zhang, E.ら、Proc Natl Acad Sci USA 94:9562-95

10

20

30

40

50

67)) ; 及び N R G 4 (Harari, D.ら、Oncogene 18:2681-2689))。選択的スプライシングの結果として、受容体結合に必要な N R G 1 E G F 様ドメインの2つの活性アイソフォームが存在し、N R G 1 a l p h a (N R G 1) 及び N R G 1 b e t a (N R G) と呼ばれている。例示的なヒトの N R G 1 の配列は、Genbank 受託番号 B K 0 0 0 3 8 3 (Falls, D. L., Ex Cell Res, 284:14-30 (2003) 及び米国特許第 5 3 6 7 0 6 0 に示されている。一実施態様において、N R G 1 は、S w i s s P r o t 受託番号 Q 7 R T V 8 (配列番号 : 9) のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 5 】

本明細書での「HER二量体」は、少なくとも2つのHERレセプターを含む非共有結合的に結合する二量体である。このような複合体は、2以上のHERレセプターを発現する細胞がHERリガンドに曝される場合に形成され得、免疫沈降によって単離され、例えば S l i w k o w s k i ら, J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994) に記載のように S D S - P A G E により分析されうる。サイトカインレセプターサブユニット (例えば g p 1 3 0) などの他のタンパク質は該二量体と結合されうる。

【 0 0 6 6 】

本明細書での「HERヘテロ二量体」は、E G F R - H E R 2、E G F R - H E R 3、E G F R - H E R 4、H E R 2 - H E R 3 又は H E R 2 - H E R 4 ヘテロ二量体のような少なくとも2つの異なるHERレセプターを含む非共有結合的に結合するヘテロ二量体である。

【 0 0 6 7 】

「HER阻害剤」は、HER活性化又は機能を妨げる薬剤である。HER阻害剤の例としては、HER抗体 (例えば、E G F R、H E R 2、H E R 3、又は H E R 4 抗体) ; E G F R 標的薬 ; 小分子HERアンタゴニスト ; HERチロシンキナーゼ阻害剤 ; ラパチニブ / G W 5 7 2 0 1 6 等の H E R 2 及び E G F R 二重チロシンキナーゼ阻害剤 ; アンチセンス分子 (例えば国際公開第 2 0 0 4 / 8 7 2 0 7 号参照) ; 及び / 又は、M A R K 又は A k t 等の下流のシグナル伝達分子に結合するか、又はこれらの機能を妨害する薬剤が含まれる。好ましくは、該HER阻害剤は、HERレセプターに結合する抗体である。一実施態様において、HER阻害剤は、HERレセプターに結合する抗体である。一実施態様において、HER阻害剤は、HER3阻害剤である。実施態様において、阻害剤は、HER3及びE G F R、HER3及びHER2、又はHER3及びHER4の両方を阻害するようなものである二重特異性HER阻害剤である。一実施態様では、HER阻害剤は、HER3及びE G F Rの両方に特異的である二重特異性抗体である。このような阻害剤の一例としては、M E H D 7 9 4 5 A としても知られている二重特異性抗体 D L 1 1 f がある。

【 0 0 6 8 】

「HER二量体化阻害剤」又は「HDI」は、HERホモ二量体又はHERヘテロ二量体の形成を阻害する薬剤である。好ましくは、HER二量体化阻害剤は抗体である。しかしながら、HER二量体化阻害剤は、HERホモ又はヘテロ二量体の形成を阻害するペプチド及び非ペプチド小分子、及び他の化学物質もまた含む。

【 0 0 6 9 】

「HER二量体化を阻害する」抗体は、根底にある機序にかかわらず、HER二量体の形成を阻害するか、又は妨害する抗体である。一実施態様では、このような抗体は、HER2のそのヘテロ二量体結合部位に結合する。二量体化阻害抗体の特定の一例は、ペルツズマブ (P m a b) 又は M A b 2 C 4 である。HER二量体化阻害剤の他の例は、E G F R に結合し—又は複数の他のHERレセプターとのその二量体化を阻害する抗体 (例えば、活性化された又は「非テザー」E G F R に結合する E G F R モノクローナル抗体 8 0 6、M A b 8 0 6 ; Johnら J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004) を参照) ; H E R 3 に結合し—又は複数の他のHERレセプターとの二量体化を阻害する抗体 ; H E R 4 に結合し—又は複数の他のHERレセプターとの二量体化を阻害する抗体 ; ペプチド二量体化阻害剤 (米国特許第 6 4 1 7 1 6 8 号) ; アンチセンス二量体化阻害剤等である。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される場合、「EGFRアンタゴニスト」又は「EGFR阻害剤」は、EGFRに特異的に結合し、そのシグナル伝達活性を妨げるか又は減少させ、HER2、HER3、又はHER4に特異的には結合しない化合物を意味する。このような薬剤の例は、EGFRに結合する抗体及び小分子を含む。EGFRに結合する抗体の例は、MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB 8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(米国特許第4943533号、Mendelsohnら参照)及びその変異体、例えばキメラ化225(C225又はセツキシマブ；ERBITUX(登録商標))及び再形成ヒト225(H225)(国際公開第96/40210号、Imclone Systems Inc.を参照)；IMC-11F8、完全ヒトEGFR標的抗体(Imclone)；タイプII変異体EGFRに結合する抗体(米国特許第5212290号)；米国特許第5891996号に記載されているようなEGFRに結合するヒト化及びキメラ化抗体；及びEGFRに結合するヒト抗体、例えばABX-EGF又はパニツムマブ(国際公開第98/50433、Abgenix/Amgenを参照)；EMD55900(Stragliottoら Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996))；EMD7200(マツズマブ)、EGFR結合についてEGF及びTGF- 双方と競合するEGFRに対するヒト化EGFR(EMD/Merck)；ヒトEGFR抗体、HuMax-EGFR(GenMab)；E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3及びE7.6.3として知られ、米国特許第6235883号に記載されている完全なヒト抗体；MDX-447(Medarex Inc)；及びmAb 806又はヒト化mAb 806(Johnsら、J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384(2004))を含む。抗EGFR抗体は細胞傷害剤とコンジュゲートされてよく、よってイムノコンジュゲートを生じる(例えば、欧州特許出願公開第659439A2号、Merck Patent GmbH参照)。EGFRアンタゴニストは小分子、例えば米国特許第5616582号、同第5457105号、同第5475001号、同第5654307号、同第5679683号、同第6084095号、同第6265410号、同第6455534号、同第6521620号、同第6596726号、同第6713484号、同第5770599号、同第6140332号、同第5866572号、同第6399602号、同第6344459号、同第6602863号、同第6391874号、同第6344455号、同第5760041号、同第6002008号、及び同第5747498、並びに次のPCT公報：国際公開第98/14451号、国際公開第98/50038号、国際公開第99/09016号、及び国際公開第99/24037号に記載されている化合物を含む。特定の小分子EGFRアンタゴニストは、OSI-774(CP-358774、エルロチニブ、タルセバ(登録商標)Genentech/OSI Pharmaceuticals)；PD 183805(CI 1033、2-プロペンアミド、N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3-(4-ホルホルニル)プロポキシ]-6-キナゾリニル]-、二塩酸塩、Pfizer Inc.)；ZD 1839、ゲフィチニブ(IRESSA(登録商標))4-(3'-クロロ-4'-フルオロアニリノ)-7-メトキシ-6-(3-ホルホルノプロポキシ)キナゾリン、AstraZeneca)；ZM 105180((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル-アミノ)-キナゾリン、Zeneca)；BIBX-1382(N8-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N2-(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン、Boehringer Ingelheim)；PKI-166((R)-4-[4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール)；(R)-6-(4-ヒドロキシフェニル)-4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン)；CL-387785(N-[4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチナミド)；EKB-569(N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-3-シアノ-7-エトキシ-6-キノリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブテナミド)(Wyeth)；AG 1478(Sugen)；及びAG 1571(SU 5271；Sugen)を含む。

【0071】

「HER抗体」は、HERレセプターに結合する抗体である。場合によっては、HER抗体はHER活性化又は機能を更に妨害する。特定のHER2抗体はペルツズマブ及びトラスツズマブを含む。特定のEGFRの例はセツキシマブ及びパニツムマブを含む。例

示的な抗HER3抗体については、国際公開第2011076683号(Mab205.10.1、Mab205.10.2、Mab205.10.3)、US7846440; US7705130及びUS5968511に記載されている。

【0072】

HER抗体に関連した特許公報は：US5677171、US5720937、US5720954、US5725856、US5770195、US5772997、US6165464、US6387371、US6399063、US2002/0192211A1、US6015567、US6333169、US4968603、US5821337、US6054297、US6407213、US6719971、US6800738、US2004/0236078A1、US5648237、US6267958、US6685940、US6821515、国際公開第98/17797号、US6333398、US6797814、US6339142、US6417335、US6489447、国際公開第99/31140号、US2003/0147884A1、US2003/0170234A1、US2005/0002928A1、US6573043、US2003/0152987A1、国際公開第99/48527号、US2002/0141993A1、国際公開第01/00245号、US2003/0086924、US2004/0013667A1、国際公開第00/69460号、国際公開第01/00238号、国際公開第01/15730号、US6627196B1、US6632979B1、国際公開第01/00244号、US2002/0090662A1、国際公開第01/89566号、US2002/0064785、US2003/0134344、国際公開第04/24866号、US2004/0082047、US2003/0175845A1、国際公開第03/087131号、US2003/0228663、国際公開第2004/008099A2号、US2004/0106161、国際公開第2004/048525号、US2004/0258685A1、US5985553、US5747261、US4935341、US5401638、US5604107、国際公開第87/07646号、国際公開第89/10412号、国際公開第91/05264号、EP412116B1、EP494135B1、US5824311、EP444181B1、EP1006194A2、US2002/0155527A1、国際公開第91/02062号、US5571894、US5939531、EP502812B1、国際公開第93/03741号、EP554441B1、EP656367A1、US5288477、US5514554、US5587458、国際公開第93/12220号、国際公開第93/16185号、US5877305、国際公開第93/21319号、国際公開第93/21232号、US5856089、国際公開第94/22478号、US5910486、US6028059、国際公開第96/07321号、US5804396、US5846749、EP711565、国際公開第96/16673号、US5783404、US5977322、US6512097、国際公開第97/00271号、US6270765、US6395272、US5837243、国際公開第96/40789号、US5783186、US6458356、国際公開第97/20858号、国際公開第97/38731号、US6214388、US5925519、国際公開第98/02463号、US5922845、国際公開第98/18489号、国際公開第98/33914号、US5994071、国際公開第98/45479号、US6358682B1、US2003/0059790、国際公開第99/55367号、国際公開第01/20033号、US2002/0076695A1、国際公開第00/78347号、国際公開第01/09187号、国際公開第01/21192号、国際公開第01/32155号、国際公開第01/53354号、国際公開第01/56604号、国際公開第01/76630号、国際公開第02/05791号、国際公開第02/11677号、US6582919、US2002/0192652A1、US2003/0211530A1、国際公開第02/44413号、US2002/0142328、US6602670B2、国際公開第02/45653号、国際公開第02/055106号、US2003/0152572、US2003/016584

0、国際公開第02/087619号、国際公開第03/006509号、国際公開第03/012072号、国際公開第03/028638、US2003/0068318、国際公開第03/041736号、EP1357132、US2003/0202973、US2004/0138160、US5705157、US6123939、EP616812B1、US2003/0103973、US2003/0108545、US6403630B1、国際公開第00/61145号、国際公開第00/61185号、US6333348B1、国際公開第01/05425号、国際公開第01/64246号、US2003/0022918、US2002/0051785A1、US6767541、国際公開第01/76586号、US2003/0144252、国際公開第01/87336号、US2002/0031515A1、国際公開第01/87334号、国際公開第02/05791号、国際公開第02/09754号、US2003/0157097、US2002/0076408、国際公開第02/055106号、国際公開第02/070008号、国際公開第02/089842号、国際公開第03/86467号、国際公開第2010/108127号、及び国際公開第2011/076683号。

10

20

30

40

50

【0073】

「HER活性化」は、任意の一又は複数のHERレセプターの、活性化又はリン酸化を意味する。一般的に、HER活性化はシグナル伝達を生じる(例えば、HERレセプター又は基質ポリペプチドのチロシン残基をリン酸化するHERレセプターの細胞内キナーゼドメインにより引き起こされるもの)。HER活性化は、対象のHERレセプターを含むHER二量体に、HERリガンドが結合することにより媒介されてよい。HER二量体へのHERリガンドの結合により、二量体のHERレセプターの一又は複数のキナーゼドメインが活性化され、このことにより一又は複数のHERレセプターのチロシン残基のリン酸化、及び/又は更なる基質ポリペプチド(一又は複数)、例えばAkt又はMAPK細胞内キナーゼのチロシン残基のリン酸化が生じる。

【0074】

「リン酸化」は、HERレセプター又はその基質等のタンパク質への一又は複数のホスフェート基の付加を意味する。

【0075】

HER2上の「ヘテロ二量体結合部位」は、二量体の形成の際にEGFR、HER3又はHER4の細胞外ドメインの領域と接触する又は作用するHER2の細胞外ドメインの領域を意味する。領域は、HER2のドメインIIにみられる。Franklinら Cancer Cell 5:317-328 (2004)。

【0076】

HER2の「ヘテロ二量体結合部位に結合する」HER2抗体はドメインIIの残基に結合し(そして、場合によって、また、HER2細胞外ドメインの他のドメイン、例えばドメインI及びIIIの残基とも結合する)、HER2-EGFR、HER2-HER3又はHER2-HER4ヘテロ二量体の形成を、少なくともある程度は、立体的に妨げることができる。Franklinら Cancer Cell 5:317-328 (2004)はHER2-パーツズマブ結晶構造の特徴を表しており、RCSBタンパク質データバンク(IDコードIS78)に寄託され、HER2のヘテロ二量体結合部位と結合する例示的な抗体を例示する。

【0077】

HER2の「ドメインIIに結合する」抗体は、HER2のドメインIIの残基及び場合によってはHER2の他のドメイン、例えばドメインI及びIIIの残基に結合する。

【0078】

「単離された」とは、本明細書に開示された様々な抗体を記述するために使用される場合、それが発現された細胞又は細胞培養物から同定、分離、及び/又は回収された抗体を意味する。その自然環境の汚染成分とは、診断又は治療へのポリペプチドの使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)スピニングカップシークエネ

ーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端又は内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(2)クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。幾つかの実施態様では、多重特異的抗HER抗体は単離された抗体である。

【0079】

「コントロール配列」なる用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード化配列を発現させるために必要なDNA配列を意味する。原核生物に適している制御配列は、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。

10

【0080】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に置かれるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するタンパク質前駆体として発現される場合、ポリペプチドのDNAに操作可能に連結されている；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に操作可能に連結されている；又はリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に操作可能に連結されている。一般に、「操作可能に連結した」とは、連結しているDNA配列は連続しており、分泌リーダーの場合には、リーディング・フレームにあり連続している。一般的に、「作用可能に連結している」とは、結合しているDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続している必要はない。連結は、好都合な制限部位での連結反応によって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーは、従来 of 慣例に従って使用される。

20

【0081】

参照ポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保守的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、例えば公に利用できるコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して、当業者の技量の範囲にある様々な方法で達成することができる。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメーターを決定することができる。しかしながら、ここでの目的のためには、パーセントアミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社によって著作され、そのソースコードが米国著作権庁、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類と共に提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であるか、又はソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用するようコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

30

40

【0082】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは

50

、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対してある程度の % アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X / Y の 100 倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラム A L I G N - 2 の A 及び B のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に別の定義がなされない限り、ここで使用される全ての % アミノ酸配列同一性は、A L I G N - 2 コンピュータプログラムを使用して直ぐ前の段落に記載されたようにして得られる。

【 0 0 8 3 】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に相補鎖がその融点より低い環境で存在する場合における変性 DNA の再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望のホモロジーの度合いが高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにするが、低い温度はストリンジェンシーを低下させる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明は、Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995) を参照のこと。

【 0 0 8 4 】

ここに定義される「ストリンジェントな条件」又は「高いストリンジェントな条件」は、(1) 洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50 で 0.015 M の塩化ナトリウム / 0.0015 M のクエン酸ナトリウム / 0.1% のドデシル硫酸ナトリウムを用いる；(2) ハイブリダイゼーションの間にホルムアミド等の変性剤、例えば、42 で 750 mM の塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを含む pH 6.5 の 0.1% ウシ血清アルブミン / 0.1% フィコール / 0.1% ポリビニルピロリドン / 50 mM のリン酸ナトリウムバッファーによる 50% (v/v) ホルムアミドを用いる；又は(3) 0.2 x SSC (塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム)、50% ホルムアミド中での 42 での洗浄とその後の 55 での EDTA を含む 0.1 x SSC からなる高いストリンジェンシーの洗浄を伴う、42 での 50% ホルムアミド、5 x SSC (0.75 M の NaCl、0.075 M のクエン酸ナトリウム)、50 mM のリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1% のピロリン酸ナトリウム、5 x デンハード液、超音波処理サケ精子 DNA (50 μ g / mL)、0.1% SDS、及び 10% のデキストラン硫酸を用いる。

【 0 0 8 5 】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrook ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) に記載されているようにして同定され、上述のものよりストリンジェンシーが低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び % SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件の一例は、37 で、20% ホルムアミド、5 x SSC (150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 x デンハード液、10% デキストラン硫酸、及び 20 mg / mL の変性剪断サケ精子 DNA を含む溶液での終夜にわたるインキュベーションと、それに続く 37 - 50 で 1 x SSC でのフィルターの洗浄である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかが分かるであろう。

【 0 0 8 6 】

抗体「エフェクター機能」は抗体の Fc 領域(天然配列 Fc 領域又はアミノ酸配列変異体 Fc 領域)に帰因するこれらの生物学的活性に関する。抗体エフェクター機能の例は、C1q 結合及び補体依存性細胞傷害性；Fc レセプター結合；抗体依存性細胞媒介細胞傷

10

20

30

40

50

害性 (ADCC) ; 食作用 ; 細胞表面レセプターのダウンレギュレーション (例えば B 細胞レセプター) ; 及び B 細胞活性化を含む。

【0087】

「抗体依存性細胞媒介細胞障害活性」及び「ADCC」は、Fcレセプター (FcR) (例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球、及びマクロファージ) を発現する非特異性細胞障害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応に関する。抗体は細胞傷害性細胞を「武装し」、そのような死滅に絶対に必要とされる。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞はFcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcI、FcII及びFcIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492の464ページの表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するために、例えば米国特許第5500362号又は5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。あるいは、又は更に、目的の分子のADCC活性は、Clynes ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。

10

【0088】

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。更に好適なFcRは、IgG抗体 (レセプター) に結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA (「活性化レセプター」) 及びFcRIIB (「阻害レセプター」) を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化FcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン - ベース活性化モチーフ (ITAM) を有する。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン - ベース活性化モチーフ (ITIM) を有する (Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234(1997)に概説されている)。FcRはRavetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel ら, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及びde Hasら, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。用語はまた、胎児への母性IgGの移送を担う、新生児型受容体 (FcRn) も含む (Guyerら *J. Immunol.* 117:587(1976) 及びKimら, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

20

30

【0089】

「ヒトエフェクター細胞」は、一又は複数のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。好ましくは、細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞 (PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球を含む ; PBMC及びNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、その天然源、例えば血液から、単離することができる。

40

【0090】

「補体依存性細胞傷害性」又は「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を意味する。古典的補体経路の活性化は、その同族抗原に結合する (適切なサブクラスの) 抗体への補体系の第1の成分 (C1q) の結合により開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoroら, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996)に記載されているようなCDCアッセイを実施することができる。

【0091】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、

50

又は保存剤を含む。

【0092】

「抗癌療法」なる用語は、癌の治療に有用な治療法を意味する。抗癌治療剤の例は、限定しないが、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害剤、放射線療法で使用される薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、及び癌を治療するための他の薬剤、抗CD20抗体、血小板由来増殖因子阻害剤（例えば、GleevecTM（イマチニブメシレート））、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、次の標的EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-、BlyS、APRIL、BCMA又はVEGFレセプターの一又は複数に結合するアンタゴニスト（例えば中和抗体）、TRAIL/Apo2、及び他の生理活性及び有機化学薬剤等々を含む。それらの組合せもまた本発明に含まれる。

10

【0093】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えばチオテパ及びシクロフォスファミド(CYTOSAN(登録商標))；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン(piposulfan)；アジリジン類、例えばベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)；アルトレットアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ラパチオーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標)を含む)、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン(scopolactin)及び9-アミノカンプトテシン；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニボシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロルナファジン(chloronaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネスチリン(phensterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン 1I及びカリケアマイシン I1(例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；CDP323、経口-4インテグリン阻害剤；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(acclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinoophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ

20

30

40

50

- ドキソルピシン、2 - ピロリノ - ドキソルピシン、ドキソルピシン H C l リポソーム注射剤 (D O X I L (登録商標)、リポソームドキソルピシン T L C D - 9 9 (M Y O C E T (登録商標))、ペグ化リポソームドキソルピシン (C A E L Y X (登録商標)、及びデオキシドキソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン (m a r c e l l o m y c i n)、マイトマイシン C のようなマイトマイシン、マイコフェノール酸 (m y c o p h e n o l i c a c i d)、ノガラマイシン (n o g a l a m y c i n)、オリボマイシン (o l i v o m y c i n s)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (p o t f i r o m y c i n)、ピューロマイシン、ケラマイシン (q u e l a m y c i n)、ロドルピシン (r o d o r u b i c i n)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (t u b e r c i d i n)、ウベニメクス、ジノスタチン (z i n o s t a t i n)、ゾルピシン (z o r u b i c i n); 代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、ゲムシタピン (g e m c i t a b i n e) (G E M Z A R (登録商標))、テガフル (t e g a f u r) (U F T O R A L (登録商標))、カペシタピン (c a p e c i t a b i n e) (X E L O D A (登録商標))、エポチロン (e p o t h i l o n e)、及び 5 - フルオロウラシル (5 - F U); 葉酸アナログ、例えばデノプテリン (d e n o p t e r i n)、メトトレキセート、プテロプテリン (p t e r o p t e r i n)、トリメトレキセート (t r i m e t r e x a t e); プリンアナログ、例えばフルダラビン (f l u d a r a b i n e)、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン; ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン (a z a c i t i d i n e)、6 - アザウリジン (a z a u r i d i n e)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン (e n o c i t a b i n e)、フロキシウリジン (f l o x u r i d i n e); アンドロゲン類、例えばカルステロン (c a l u s t e r o n e)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン (t e s t o l a c t o n e); 抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン; 葉酸リプレニッシャー (r e p l e n i s h e r)、例えばフロリン酸 (f r o l i n i c a c i d); アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレプリン酸; エニルウラシル; アムサクリン (a m s a c r i n e); ベストラブシル (b e s t r a b u c i l); ビサントレン (b i s a n t r e n e); エダトラキセート (e d a t r a x a t e); デフォファミン (d e f o f a m i n e); デメコルシン (d e m e c o l c i n e); ジアジコン (d i a z i q u o n e); エルフォルニチン (e l f o r n i t h i n e); 酢酸エリプチニウム (e l l i p t i n i u m); エポチロン; エトグルシド (e t o g l u c i d); 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダイニン (l o n i d a i n i n e); メイタンシン (m a y t a n s i n e) 及びアンサマイトシン類 (a n s a m i t o c i n s) のようなメイタンシノイド類 (m a y t a n s i n o i d s); ミトグアゾン (m i t o g u a z o n e); ミトキサントロン; モピダンモール (m o p i d a n m o l); ニトラクリン (n i t r a c r i n e); ペントスタチン; フェナメット (p h e n a m e t); ビラルピシン; ロソキサントロン (l o s o x a n t r o n); 2 - エチルヒドラジド; プロカルバジン; P S K (登録商標) 多糖類複合体 (J H S N a t u r a l P r o d u c t s, E u g e n e, O R); ラゾキササン (r a z o x a n e); リゾキシシン (r h i z o x i n); シゾフィラン; スピロゲルマニウム (s p i r o g e r m a n i u m); テニユアゾン酸 (t e n u a z o n i c a c i d); トリアジコン (t r i a z i q u o n e); 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (t r i c h o t h e c e n e s) (特に、T - 2 トキシシン、ベラキュリン A (v e r r a c u r i n A)、ロリジン A (r o r i d i n A) 及びアングイジン (a n g u i d i n e)); ウレタン; ビンデシン (E L D I S I N E (登録商標)、F I L D E S I N (登録商標)); ダカルバジン; マンノムスチン (m a n n o m u s t i n e); ミトプロニトール; ミトラクトール (m i t o l a c t o l); ピボプロマン (p i p o b r o m a n); ガシトシン (g a c y t o s i n e); アラビノシド (「A r a - C」); チオテパ; タキソイド、例えばパクリタキセル (T A X O L (登録商標))、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (A B R A X A N E T M)、及びドキシタキセル (T A X O T E R E (登録商標)); クロランブシル; 6 - チオグアニン; メルカプトプリン

；メトトレキサート；プラチナ剤、例えばシスプラチン、オキサリプラチン(例えばE L O X A T I N (登録商標))及びカルボプラチン；ピンカ類でチューブリン重合の微小管形成を阻害するもの、例えばピンラスチン(V E L B A N (登録商標)、ピンクリスチン(O N C O V I N (登録商標))、ピンデシン(E L D I S I N E (登録商標)、F I L D E S I N (登録商標))、及びビノレルピン(N A V E L B I N E (登録商標))；エトボシド(V P - 1 6)；イフォスファミド；ミトキサントロン；ロイコボピン(l e u c o v o v i n)；ノバントロン(n o v a n t r o n e)；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(i b a n d r o n a t e)；トポイソメラーゼ阻害薬R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸などのレチノイド、例えば、ベキサロテン(T A R G R E T I N (登録商標))；ビスホスホネート、例えばクロドロネート(例えばB O N E F O S (登録商標)又はO S T A C (登録商標))、エチドロロン酸(D I D R O C A L (登録商標))、N E - 5 8 0 9 5、ゾレドロロン酸/ゾレドロネート(Z O M E T A (登録商標))、アレンドロネート(F O S A M A X (登録商標))、パミドロロン酸(A R E D I A (登録商標))、チルドロン酸(S K E L I D (登録商標))、又はリセドロロン酸(A C T O N E L (登録商標))；トロキサシタピン(t r o x a c i t a b i n e)(1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばP K C - 、R a f、及びH - R a s、及び上皮増殖因子レセプター(E G F - R)；T H E R A T O P E (登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばA L L O V E C T I N (登録商標)ワクチン、L E U V E C T I N (登録商標)ワクチン、及びV A X I D (登録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害薬(例えばL U R T O T E C A N (登録商標))；r m R H (例えばA B A R E L I X (登録商標))；B A Y 4 3 9 0 0 6 (ソラフェニブ；B a y e r)；S U - 1 1 2 4 8 (スニチニブ、S U T E N T (登録商標)、P f i z e r)；ペリフォシン(p e r i f o s i n e)、C O X - 2 阻害剤(例えばセレコキシブ又はエトリコキシブ)、プロテオゾーム阻害剤(例えばP S 3 4 1)；ボルテゾミブ(V E L C A D E (登録商標))；C C I - 7 7 9；チピファルニブ(t i p i f a r n i b)(R 1 1 5 7 7)；オラフィニブ(o r a f e n i b)、A B T 5 1 0；B C L - 2 阻害剤、例えばオブリメルセンナトリウム(o b l i m e r s e n s o d i u m)(G E N A S E N S E (登録商標))；ピクサントロン；E G F R 阻害剤(以下の定義を参照)；チロシンキナーゼ阻害剤；セリン - スレオニンキナーゼ阻害剤、例えばラパマイシン(シロリムス、R A P A M U N E (登録商標))；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えばロナファーニブ(S C H 6 6 3 6, S A R A S A R T M)；及び上述したものの何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体；並びに上記のうち2以上の組合せ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロンの併用療法の略称であるC H O P；及び5 - F U及びロイコボリンとオキサリプラチン(E L O X A T I N T M)を組合せた治療法の略称であるF O L F O Xが含まれる。

【0094】

ここで定義された化学療法剤には、癌の増殖を促進しうるホルモンの効果を調節、低減、ブロック、又は阻害するように働く「抗ホルモン剤」又は「内分泌治療剤」が含まれる。それらはそれ自体がホルモンであってもよく、限定するものではないが、混合アゴニスト/アンタゴニストプロファイルを持つ抗エストロゲン、例えばタモキシフェン(N O L V A D E X (登録商標))、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン(F A R E S T O N (登録商標))、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン(raloxifene)(E V I S T A (登録商標))、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、及びS E R M 3 などの選択的なエストロゲン受容体調節因子(S E R M)；アゴニスト特性を有さない純粋な抗エストロゲン類、例えばフルベストラント(F A S L O D E X (登録商標))、及びE M 8 0 0 (このような薬剤はエストロゲン受容体(E R)二量体化をブロックし、DNA結合を阻害し、E R代謝回転を増加させ、及び/又はE Rレベルを抑制しうる)；アロマターゼ阻害剤、例えば、ホルメスタン及びエキセメスタン(A R O M A S I N (登録商標))などのステロイド系アロマターゼ阻害剤、及びアナストロゾール(A R I M I D

10

20

30

40

50

EX(登録商標)、レトロゾール(FEMARA(登録商標))及びアミノグルテチミドなどの非ステロイド性アロマトーゼ阻害剤、及びボロゾール(RIVISOR(登録商標))、メゲストロールアセテート(MEGASE(登録商標))、ファドロゾール及び4(5)-イミダゾールを含む他のアロマトーゼ阻害剤；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えばロイプロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、ゴセレリン、ブセレリン、及びトリプトレリン；性ステロイド、例えばプロゲステロン、例えばメゲストロールアセテート及びメドロキシプロゲステロンアセテート、エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロール及びプレマリン、及びアンドロゲン/レチノイド、例えばフルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸及びフェンレチニド；オナプリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御因子(ERD)；抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド；及び上記の何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体；並びに、上記のうちの2以上の組合せを含む。

【0095】

「被験者」とは、脊椎動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物は、限定しないが、ヒト、非ヒト高等霊長類、霊長類、家畜(例えばウシ)、競技動物、ペット(例えば、ネコ、イヌ、及びウマ)、及び実験動物(例えば、マウス及びラット)を含む。

【0096】

タンパク質の「発現」とは、遺伝子にコードされている情報からメッセンジャーRNA(mRNA)への、そして、その後のタンパク質への変換を意味する。

【0097】

本明細書において、目的のタンパク質(例えば、(ニューレグリン1などの)ニューレグリン及び/又はHER3)を「発現している」サンプル又は細胞とは、そのタンパク質をコードしているmRNA又はそのタンパク質(その断片を含む)が、そのサンプル又は細胞中に存在すると決定されているものである。

【0098】

あるタイプの癌において、「NRG1発現について中央値のレベルよりも高いレベルでNRG1を発現する」サンプル、細胞、腫瘍又は癌は、NRG1発現のレベルが、当業者に「高NRG1値」とみなされるものである。この癌はまた、「NRG1を過剰発現する」と考えられる。一般的には、このような値は、同種の癌のサンプル、細胞、腫瘍又は癌の集団におけるNRG1の値に対して、約50から約100%までの範囲である。例えば、発現の中央値に達するように用いられる集団は、進行性、難治性又は再発性HNSCC癌と同様に、化学療法抵抗性HNSCC癌、EGFR阻害剤耐性HNSCC癌などの一般的なHNSCCのサンプル、又はそのサブグループであってよい。本明細書の実施例は、発現の中央値が決定される方法を示している。これは、発現の絶対値を構成してよい。一実施態様において、高NRG1レベルとみなされるNRG1発現のレベルは、60パーセント以上、70パーセント以上、75パーセント以上、80パーセント以上、85パーセント以上、90パーセント以上、95パーセント以上、97パーセント以上、98パーセント以上、又は99パーセント以上である。このような値は、本明細書に開示されるような定量RT-PCRのような指定のアッセイ条件下のアッセイで定量し、実施例5と同様に最も好ましくは定量RT-PCRアッセイされる。一実施態様において、NRG1発現レベルは、参照遺伝子としてAL-137727(配列番号：10；配列番号：11)、及びVPS33B(配列番号：12)の発現レベルの平均値を用いて、デルタCt法で計算される。

【0099】

特定の種類の癌では、NRG1の発現は、その種類の癌に罹患している患者集団において二峰性である。二峰性の発現プロファイルは、高レベルのNRG1発現を示す患者のグループ(過剰発現モード)、及び、より低いNRG1発現レベルを示す患者のグループ(過剰発現モードの欠如)から構成される。一実施態様において、2つのモード間の変曲点は、「NRG1を過剰発現する(癌が変曲点よりも高いNRG1発現レベルを有する)」

10

20

30

40

50

癌であるか、又は「NRG1の過剰発現を欠いている（癌が変曲点よりも低いNRG1発現レベルを有する）」癌のいずれかであるか、癌の種類を特徴付けるための値として使用される。一実施態様において、二成分混合ガウス分布は、NRG1の過剰発現とNRG1の過剰発現の欠如との間の変曲点を推定するために使用される。一実施態様において、NRG1発現レベルは、参照遺伝子としてAL-137727及びVPS33Bを使用して計算される。

【0100】

「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」の技術は、本明細書で使用される場合、微量の特有な1片の核酸、RNA及び/又はDNAが、1987年7月28日発行の米国特許第4683195号中に記載されたように増幅される手法に全般的に関する。一般的に、対象とする領域の末端から又は利用可能の必要性を越える配列情報は、オリゴヌクレオチドプライマーの設計を可能にし；これらのプライマーは増幅されるテンプレートの反対鎖の配列と同一又は類似している。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは増幅された物質の末端と一致する。PCRは、特異的RNA配列、全ゲノムDNAからの特異的DNA配列、及び全細胞性RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージ又はプラスミド配列などを増幅するために用いることができる。一般的に、Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)を参照。本明細書で使用する場合、PCRは、唯一ではないが、プライマーとして既知の核酸(DNA又はRNA)の使用を含む核酸試験サンプルを増幅するための核酸ポリメラーゼ反応法の一例と考えられており、核酸ポリメラーゼを利用して、核酸の特定の部分を増幅又は生成し、又は特定の核酸に相補的である核酸の特定の部分を増幅又は生成する。

10

20

【0101】

「定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応」又は「定量RT-PCR」はPCRの一形態を指し、ここではPCR産物の量はPCR反応の各工程で測定される。この手法は、Croninら、Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004); 及びMaら、Cancer Cell 5:607-616 (2004)を含む様々な出版物に記載されている。

【0102】

「マイクロアレイ」なる用語は、基質上の、ハイブリダイズ可能なアレイ要素、好ましくはポリヌクレオチドプローブの秩序だった配置を意味する。

30

【0103】

単数又は複数で使用される場合、「ポリヌクレオチド」なる用語は、一般に任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを意味し、これは未修飾RNA又はDNA又は修飾RNA又はDNAであり得る。よって、例えば、ここで定義されるポリヌクレオチドには、限定するものではないが、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、及び一本鎖及び二本鎖領域を含むRNA、一本鎖であってもよく、又はより典型的には二本鎖であっても又は一本鎖又は二本鎖領域を含んでもよいDNA及びRNAを含む混成分子が含まれる。また「ポリヌクレオチド」なる用語は、ここで使用される場合RNA又はDNA又はRNAとDNAの双方を含む三本鎖領域を意味する。そのような領域のストランドは同じ分子由来でも又は異なった分子由来でもよい。その領域は一又は複数の分子の全てを含みうるが、より典型的には幾らかの分子の領域のみを含む。三本ヘリックス領域の分子の一つがしばしばオリゴヌクレオチドである。「ポリヌクレオチド」なる用語は特にcDNAsを含む。その用語には、一又は複数の修飾塩基を含むDNA(cDNAを含む)及びRNAが含まれる。よって、安定性又は他の理由のために修飾された骨格を持つDNA又はRNAは、その用語がここで意図するところの「ポリヌクレオチド」である。更に、イノシンのような希な塩基又はトリチウム化塩基のような修飾された塩基を含むDNA又はRNAはここで定義される「ポリヌクレオチド」という用語内に含まれる。一般に、「ポリヌクレオチド」という用語は未修飾のポリヌクレオチドの全ての化学的、酵素的及び/又は代謝的に修飾された形態並びに単純細胞及び複雑細胞を含む細胞及びウイルスに特徴的なDNA及びRNAの化学的形態

40

50

を包含する。

【0104】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、限定するものではないが、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖又は二本鎖リボヌクレオチド、RNA：DNAハイブリッド及び二本鎖DNAを含む比較的短いポリヌクレオチドを意味する。一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドは、例えば市販されている自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して、化学的方法によってしばしば合成される。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、インビトロ組換えDNA媒介法を含む様々な他の方法によって、及び細胞及び生物中でのDNAの発現によって、作製することができる。

【0105】

「遺伝子増幅」という句は、特定の細胞又は細胞系において多コピーの遺伝子又は遺伝子断片が形成されるプロセスを指す。複製された領域(増幅されたDNAのストレッチ)は「アンプリコン」と称されることが多い。通常は、産生するメッセンジャーRNA(mRNA)の量も、発現される特定の遺伝子でできたコピーの数の割合で増加する。

【0106】

「天然配列」ポリペプチドは、自然発生変異体又は対立遺伝子変異体を含む、天然由来のポリペプチド(例えば、HERレセプター又はHERリガンド)と同一のアミノ酸配列を有するものである。このような天然配列ポリペプチドは、自然から単離しうるし、組換え又は合成手段により生産しうる。したがって、天然配列ポリペプチドは、天然に生じるヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、又は特定の他の哺乳動物種のアミノ酸配列を有しうる。

【0107】

本明細書において、患者はヒト患者である。患者は「癌患者」、すなわち、癌の一以上の症状に罹患しているか又は罹患するリスクにある者であり得る。

【0108】

本明細書における「腫瘍サンプル」とは、患者の腫瘍由来のサンプルであるか、又はその腫瘍由来の腫瘍細胞を含むサンプルである。腫瘍サンプルの例は、限定されないが、腫瘍生検、循環性腫瘍細胞、循環性血漿タンパク質、腹水、腫瘍に由来するか又は腫瘍のような特性を呈する細胞株又は初代細胞培養物、並びに、ホルマリン固定腫瘍サンプル、パラフィン包埋腫瘍サンプル又は凍結腫瘍サンプルなどの保存された腫瘍サンプルを含む。

【0109】

「固定」腫瘍サンプルとは、固定剤を用いて組織学的に保存処理されているサンプルである。

【0110】

「ホルマリン固定」腫瘍サンプルは、固定剤としてホルムアルデヒドを用いて保存処理されているサンプルである。

【0111】

「包埋された」腫瘍サンプルとは、パラフィン、ろう、セロイジン、又は樹脂などの堅固で且つ一般的に硬い媒質により囲まれているサンプルである。包埋によって、顕微鏡検査用又は組織マイクロアレイ(TMA)作成用の薄切片を切り出すことが可能になる。

【0112】

「パラフィン包埋」腫瘍サンプルとは、石油由来固体炭化水素の精製混合物に囲まれているサンプルである。

【0113】

本明細書において、「凍結」腫瘍サンプルとは、凍結しているか、又は凍結されている腫瘍サンプルを指す。

【0114】

「HERの発現、増幅、又は活性化を示す」癌又は生体サンプルとは、診断検査において(過剰発現を含めて)HERレセプターを発現し、HER遺伝子を増幅しており、且つ/又はその他の方法でHERレセプターの活性化もしくはリン酸化を示すものである。

10

20

30

40

50

【0115】

「HERレセプターを過剰発現又は増幅」する腫瘍細胞は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、有意に高いレベルのHER受容体タンパク質又は遺伝子を有する。そのような過剰発現は、遺伝子増幅により、又は転写もしくは翻訳の増加によって引き起こされることがある。HERレセプターの過剰発現は、細胞の表面に存在するHERタンパク質の増加したレベルを評価することによって、診断又は予後アッセイで（例えば免疫組織化学アッセイ；IHCによって）決定することができる。又は、もしくは追加的に、例えば蛍光インサイツハイブリダイゼーション法（FISH；1998年10月に公開された国際公開第98/45479号を参照されたい）、サザンブロット法、又は定量リアルタイムPCR（qRT-PCR）などのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により細胞中のHER2核酸レベルを測定することができる。血清などの生体液中の分断されたシェッド抗原（例えばHER細胞外ドメイン）を測定することによって、HERレセプターの過剰発現を研究することもできる（例えば、1990年6月12日に発行された米国特許第4933294号；1991年4月18日に公開された国際公開第91/05264号；1995年3月28日に発行された米国特許第5401638号；及びSiasら、J. Immunol. Methods 1990; 132: 73-80を参照のこと）。上記アッセイ以外に、様々なインビボアッセイが当業者に利用できる。例えば検出可能なラベル、例えば放射性同位体で場合により標識した抗体に、患者の体内の細胞を曝露して、例えば放射能を外部スキャンすることにより、又は抗体に予め曝露された患者から採取した生検を分析することにより、その患者における細胞に対する抗体の結合を評価することができる。

10

20

【0116】

逆に、「HERレセプターを過剰発現も増幅もしない」癌とは、同じ組織型の非癌性細胞に比べて正常レベルよりも高いHERレセプターのタンパク質も遺伝子も正常な値よりも高い値を有さない癌である。ペルツズマブなどのHER二量体化を阻害する抗体を使用して、HER2レセプターを過剰発現も増幅もしない癌を治療してもよい。

【0117】

本明細書において、「抗腫瘍剤」とは、癌を治療するために使用される薬剤を指す。本明細書における抗腫瘍剤の非限定的な例としては、化学療法剤、HER阻害剤、HER二量体化阻害剤、HER抗体、腫瘍関連抗原に対する抗体、抗ホルモン化合物、サイトカイン、EGFR標的化薬物、抗血管形成剤、チロシンキナーゼ阻害剤、増殖阻害剤及び抗体、細胞毒性剤、アポトーシスを誘導する抗体、COX阻害剤、ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害剤、ガン胎児タンパク質CA125と結合する抗体、HER2ワクチン、Raf阻害剤又はras阻害剤、リボソームドキシソルピシン、トポテカン、タキサン、二重チロシンキナーゼ阻害剤、TLK286、EMD-7200、ペルツズマブ、トラスツズマブ、エルロチニブ、及びペバシズマブが挙げられる。

30

【0118】

「認可された抗腫瘍剤」とは、食品医薬品局(FDA)又は外国の同等機関などの監督機関により販売許可を与えられた、癌を治療するために用いられる薬剤である。

【0119】

HER3阻害剤が「単一抗腫瘍剤」として投与される場合、その阻害剤はそのガンを処置するために投与される唯一の抗腫瘍剤であり、即ち、その阻害剤は化学療法剤などの別の抗腫瘍剤と組み合わせて投与されない。

40

【0120】

本明細書における「診療標準(standard of care)」とは、特定の形態の癌を治療するために日常的に使用される抗腫瘍剤を意味する。

【0121】

「増殖阻害剤」とは、本明細書において用いる場合、細胞、特にHER発現癌細胞の増殖をインビトロ又はインビボのいずれかで阻害する化合物又は組成物を指す。このように、増殖阻害剤は、S期のHER発現細胞の割合を有意に低減する薬剤であってもよい。増殖阻害剤の例としては、G1停止及びM期停止を誘導する薬剤などの、細胞周期の進行を

50

(S期以外の位置で)遮断する薬剤が挙げられる。古典的なM期遮断薬としては、ビンカ(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキサン、ならびにドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びプレオマイシンなどのトポII阻害剤が挙げられる。G1で停止させる薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-CなどのDNAアルキル化剤はまた、S期停止にも波及する。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, 編集の、Murakamiらによる「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(WB Saunders: Philadelphia, 1995)という標題の第1章、特に13頁に見出すことができる。

【0122】

「増殖阻害」抗体の例は、HERに結合し、HERを過剰発現している癌細胞の増殖を阻害する抗体である。

【0123】

「アポトーシスを誘導する」抗体とは、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞の断片化、及び/又は膜小胞(アポトーシス小体と呼ばれる)の形成によって決定されるようなプログラムされた細胞死を誘導する抗体である。アポトーシスに関連する細胞事象を評価するために様々な方法が利用できる。例えば、アネキシンの結合によってホスファチジルセリン(PS)の移行を測定でき;DNAラダー生成によってDNAの断片化を評価することができ;低二倍体細胞の任意の増加によってDNAの断片化と同時に核/クロマチンの凝縮を評価することができる。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、BT474細胞を用いたアネキシン結合アッセイにおいて、未処理細胞と比較して約2から50倍、好ましくは約5から50倍、最も好ましくは約10から50倍のアネキシン結合の誘導を招く抗体である。

【0124】

「治療」とは、治療的処置及び予防措置又は阻止措置の両方を指す。治療を必要とする者としては、すでにそのガン有する者及びそのガンが予防されるべき者が包含される。したがって、本明細書において治療されるべき患者は、癌を有すると診断されていてもよいし、又は、癌の素因があるか、もしくは癌に感受性であってもよい。

【0125】

「治療的有効量」又は「有効量」という用語は、患者の癌を治療するために有効な薬剤の量を意味する。薬剤の有効量は、癌細胞の数を減少させ;腫瘍の大きさを減少させ;末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害し(即ち、ある程度遅延させ好ましくは停止させ);腫瘍の転移を阻害し(即ち、ある程度遅延させ好ましくは停止させ);ある程度腫瘍の増殖を阻害し;及び/又は癌に関連した一以上の症状をある程度和らげる場合がある。ある程度まで既存の癌細胞の成長を防ぐ、及び/又は死滅させるため、それは細胞増殖抑制性及び/又は細胞障害性であり得る。有効量により、無増悪生存が延長し(例えば、固形腫瘍のための応答評価基準(Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST)又はCA-125の変化により測定される)、他覚的(客観的)応答(一部寛解(PR)又は完全寛解(CR)を含む)が生じ、生存(全生存及び無増悪生存を含む)が改善され、及び/又は癌の1つ以上の症状(例えば、FOSIにより評価される)が改善され得る。最も好ましくは、治療的有効量の薬物は、無増悪生存(PFS)及び/又は全生存(OS)を改善するのに有効である。

【0126】

「生存」は、生存している患者を指し、全生存並びに無増悪生存を含む。

【0127】

「全生存」は、診断又は治療の時から例えば1年、5年などの定められた期間において生存している患者を指す。

【0128】

「無増悪生存」とは、癌の進行又は悪化することなく、患者が生き残っていることを言う。

10

20

30

40

50

【0129】

「生存延長」とは、治療された患者における全生存又は無増悪生存が、未治療患者と比較して（即ち、二重特異性HER3/EGFR阻害剤MEHD7945AなどHER阻害剤で治療されていない患者と比較して）、又は指定されたレベルでのNRG1を発現しない患者と比較して、及び/又は承認された抗腫瘍剤で治療された患者と比較して延長していることを意味する。

【0130】

「客観的反応」とは、完全寛解（CR）又は部分寛解（PR）を含めて、測定可能な反応を意味する。

【0131】

「完全寛解」又は「CR」は、治療に反応して癌の全ての徴候の消失を目的としている。これは、必ずしも癌が治癒されたという意味ではない。

【0132】

「部分寛解」又は「PR」は、治療に回答して、1つ以上の腫瘍又は病変の大きさの減少、又は体内での癌の程度の低下を指す。

【0133】

本明細書で用いる用語「細胞毒性剤」とは、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。用語は、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²及びLuの放射性同位体）、化学治療剤、及び毒素、例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物起源の低分子毒素又は酵素的に活性な毒素（その断片及び/又は変異体を含む）を含むものと意図する。

【0134】

「化学療法耐性」癌とは、癌患者が化学療法レジメンを受けているにもかかわらず進行している（すなわち、患者が「プラチナ抵抗性」である）、又は癌患者が化学療法レジメンを完了した後12か月以内（例えば、6か月以内）に進行していることを意味する。

【0135】

「プラチナ耐性」癌とは、癌患者がプラチナベースの化学療法を受けているにもかかわらず進行している（すなわち、患者が「プラチナ抵抗性」である）、又は癌患者がプラチナベースの化学療法レジメンを完了した後12か月以内（例えば、6か月以内）に進行していることを意味する。

【0136】

「抗-血管形成剤」は、血管の発達を阻害する、又はある程度妨げる化合物を指す。抗-血管形成因子は、例えば、血管形成の促進に關与する成長因子又は成長因子レセプターに結合する小分子又は抗体であってもよい。ここでの好適な抗-血管形成因子は、ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標））などの、血管内皮増殖因子（VEGF）に結合する抗体である。

【0137】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン、及び従来ポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体形成ホルモン（LH）；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 及び- ；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- あるいはTGF- のようなトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイ

10

20

30

40

50

エチン(EPO); オステオインダクティブ因子; インターフェロン、
、
のようなインターフェロン; マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)
; 顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)及び顆粒球CSF(G-CSF); IL-1、
IL-1、
、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12等のインターロイキン(IL); 腫瘍壊死因子、例えばTNF-
又はTNF-
; 及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0138】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、HERレセプターなどのチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性を阻害する分子である。そのような阻害剤の例として、小分子HER2チロシンキナーゼ阻害剤、例えばTakedaから入手可能なTAK165、EGFRに優先的に結合するが、HER2及びEGFR-過剰発現細胞の両方を阻害するEKB-569(Wyethから入手可能)などの二重HER阻害剤、経口HER2及びEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるGW572016(Glaxoから入手可能)、PKI-166(Novartisから入手可能)、カネルチニブ(canertinib)などのpan-HER阻害剤(CI-1033; Pharmacia)、Raf-1阻害剤、例えばRaf-1シグナル伝達を阻害するISIS Pharmaceuticalsから入手可能なアンチセンス薬剤ISIS-5132、非HER標的TK阻害剤、例えばGlaxoから入手可能なメシル酸イマチニブ(Gleevec™)、MAPK細胞外調節キナーゼI阻害剤であるCI-1040(Pharmaciaから入手可能); PD-153035、4-(3-クロロアニリン)キナゾリンなどのキナゾリン; ピリドピリミジン; ピリミドピリミジン; CGP-59326、CGP-60261、及びCGP-62706などのピロロピリミジン(pyrrolopyrimidines); ピラゾロピリミジン(pyrazolopyrimidines)、4-(フェニルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン; カルシウム(ディフェルロイルメタン、4,5-ビス(4-フルオロアニリン)フタルイミド); ニトロチオフエン成分を含むトリホスチン(tyrphostines); PD-0183805 (Warner-Lambert); アンチセンス分子(例えば、HERコード化核酸に結合するもの); キノキサリン(quinoxalines) (米国特許第5804396号); トリホスチン(米国特許第5804396号); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); CI-1033 (Pfizer)などのpan-HER阻害剤; Affmitac (ISIS-3521; Isis/Lilly); メシル酸イマチニブ (Gleevec; Novartis); PKI-166 (Novartis); GW2016 (GlaxoSmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); セマキシニブ (Semaxanib) (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); 又は以下に挙げるいずれかの特許文献に記載されているもの: 米国特許第5804396号; 国際公開99/09016 (American Cyanamid); 国際公開98/43960 (American Cyanamid); 国際公開97/38983 (Warner Lambert); 国際公開99/06378 (Warner Lambert); 国際公開99/06396 (Warner Lambert); 国際公開96/30347 (Pfizer, Inc); 国際公開96/33978 (Zeneca); 国際公開96/3397 (Zeneca); 及び国際公開96/33980 (Zeneca)だけでなく、前段落に記載したEGFR標的薬剤を含む。

【0139】

本明細書中の治療薬の「固定」又は「変わらない」用量は、患者の重量(WT)又は体表面積(BSA)にかかわらずヒト患者に投与される用量を指す。固定用量又は変わらない用量は、mg/kgの用量又はmg/m²用量としてでなく、むしろ治療薬の絶対的

10

20

30

40

50

な量として投与されるものである。

【0140】

本明細書において、「負荷」用量は、一般に、患者に投与される治療薬の初回の用量を含んでおり、その後一又は複数の維持用量が投与される。通常、単一の負荷用量が投与されるが、複数の負荷用量が本願明細書において、考慮される。通常、投与される負荷用量（一又は複数）の量は、投与される維持用量（一又は複数）の量を超えており/又は、負荷用量（一又は複数）が維持用量（一又は複数）よりも多く投与されることが多く、そのため、維持用量で達成されるよりも早く治療薬の所望の定常状態が達成しうる。

【0141】

本明細書において、「維持」用量は、治療期間中に患者に投与される治療薬の一又は複数の用量を指す。通常、維持用量は、間をおいた治療間隔、例として、およそ毎週、およそ2週ごと、およそ3週ごと、又はおよそ4週ごとに投与される。

10

【0142】

「医薬」とは、癌を治療するための活性な薬物、例えば、HER3阻害剤、例えば、二重特異性HER3/EGFR阻害剤（例えば、MEHD7945A）である。

【0143】

「ターゲット層(target audience)」は、個々の患者、患者集団；新聞、医学文献、雑誌の読者；テレビやインターネットの視聴者；ラジオやインターネットのリスナー；医師、製薬会社など、とりわけ特定の使用、治療、又は適応症について、マーケティング又は広告により、特定の医薬が宣伝されるか又は宣伝されることが意図される人々のグループ又は機関である。

20

【0144】

「添付文書」は、効能、用法、用量、投与、禁忌、パッケージ製品と併用される他の治療用製品、及び/又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【0145】

II. 組成物及び方法

A. 例示的なHER3阻害剤

一局面において、本発明は、部分的には患者の癌におけるNRG1発現レベルに基づく種類の癌の患者のための治療を選択することに基づいている。一実施態様において、HER3阻害剤は、患者の癌がNRG1を過剰発現した場合、患者のための治療法として選択されている。一実施態様において、HER3阻害剤は、患者の癌におけるNRG1レベルが、一般に、この種類の癌におけるNRG1レベルよりも高い場合、患者のための治療として選択される。このような治療が選択された場合、患者はその後、特定の実施態様において、HER3阻害剤で治療されている。

30

【0146】

HER3阻害剤は、抗体又は他の抗原結合タンパク質、小分子、(siRNAなどの)核酸、又は任意の他のそのような分子でありうる。HER3阻害剤は、本発明の特定の実施態様では、HER3に結合NRG1を阻害する。

【0147】

一実施態様において、HER3阻害剤は抗体である。例示的な抗HER3抗体は、国際公開第2011076683号(Mab205.10.1、Mab205.10.2、Mab205.10.3)、US7846440；US7705130及びUS5968511に記載されている。

40

【0148】

一実施態様において、HER3阻害剤は、二重特異性HER3/EGFR阻害剤である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、特異的にHER3及びEGFRの両方に結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、それぞれが特異的にHER3及びEG

50

F Rの両方に結合する、二つの同一の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体である。そのような抗体については、国際公開第2010108127号、US20100255010及びSchaeferら、Cancer Cell, 20: 472-486 (2011)に記載されている。特異的にHER3及びEGFRの両方に結合する抗原結合ドメインを含むような特定の二重特異性HER3/EGFR阻害剤は、MEHD7945Aである。

【0149】

一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR抗体は、その抗体が、配列番号：1のアミノ酸配列のHVRを一つ、二つ、及び/又は三つ含んだV_Hを含む、HER3及びEGFRに特異的に結合する抗原結合ドメインを含んでいる。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR抗体は、その抗体が、配列番号：1のアミノ酸配列のHVRを一つ、二つ、及び/又は三つ含んだV_H、及び配列番号：2のアミノ酸配列のHVRを一つ、二つ、及び/又は三つ含んだV_Lを含む、HER3及びEGFRに特異的に結合する抗原結合ドメインを含んでいる。一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR抗体は、その抗体が、配列番号：1のアミノ酸配列のHVRを3つすべて含んだV_H、及び配列番号：2のアミノ酸配列のHVRを3つすべて含んだV_Lを含む、HER3及びEGFRに結合する抗原結合ドメインを含んでいる。幾つかの実施態様において、HVRは拡大HVRである。特定の一実施態様において、HVR-H1は、アミノ酸配列LSGDWIH(配列番号：3)を含み、HVR-H2は、アミノ酸配列VGEISAAAGGYTD(配列番号：4)を含み、HVR-H3は、アミノ酸配列ARESRVSFEAAMDY(配列番号：5)を含み、HVR-L1は、アミノ酸配列NIATDVA(配列番号：6)を含み、HVR-L2は、アミノ酸配列SASF(配列番号：7)を含み、及び、HVR-L3は、アミノ酸配列SEPEPYT(配列番号：8)を含む。

10

20

【0150】

一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR抗体は、HER3及びEGFRに特異的に結合する抗原結合ドメインを含み、ここで、抗体は、配列番号：1のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有するV_Hを含む。特定の一実施態様において、配列番号：1のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有するV_Hを含む二重特異性HER3/EGFRは、アミノ酸配列LSGDWIH(配列番号：3)を含むHVR-H1、アミノ酸配列VGEISAAAGGYTD(配列番号：4)を含むHVR-H2、及びアミノ酸配列ARESRVSFEAAMDY(配列番号：5)を含むHVR-H3を含む。

30

【0151】

一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR抗体は、HER3及びEGFRに特異的に結合する抗原結合ドメインを含み、ここで、抗体は配列番号：2のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有するV_Lを含む。特定の一実施態様において、配列番号：2のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有するV_Lを含む二重特異性HER3/EGFRは、NIATDVA(配列番号：6)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L1、SASF(配列番号：7)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L2、及びSEPEPYT(配列番号：8)のアミノ酸配列を含んでいるHVR-L3を含む。

40

【0152】

一実施態様において、二重特異性HER3/EGFR抗体は、抗体が配列番号：1のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有するV_H、及び配列番号：2のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有す

50

る V_L を含む、HER3 及び EGFR に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。一実施態様において、配列番号：1 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性を有する V_H 、及び配列番号：2 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性を有する V_L を含む二重特異性 HER3 / EGFR 抗体は、LSGDWIH (配列番号：3) のアミノ酸配列を含んでいる HVR - H1、VGEIS AAGGYTD (配列番号：4) のアミノ酸配列を含んでいる HVR - H2、及び ARE SRVSFEAAMDY (配列番号：5) のアミノ酸配列を含んでいる HVR - H3、N IATDVA (配列番号：6) のアミノ酸配列を含んでいる HVR - L1、SASF (配列番号：7) のアミノ酸配列を含んでいる HVR - L2、及び SEPEPYT (配列番号：8) のアミノ酸配列を含んでいる HVR - L3 を含む。

10

【0153】

一実施態様において、二重特異性 HER3 / EGFR 抗体は、抗体が配列番号：1 のアミノ酸配列を含んでいる V_H を含む、HER3 及び EGFR に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。一実施態様において、二重特異性 HER3 / EGFR 抗体は、抗体が配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでいる V_L を含む、HER3 及び EGFR に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。一実施態様において、二重特異性 HER3 / EGFR 抗体は、抗体が配列番号：1 のアミノ酸配列を含んでいる V_H 、及び配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでいる V_L を含む、HER3 及び EGFR に特異的に結合する抗原結合ド

20

【0154】

1. 抗体親和性

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、 $1 \mu\text{M}$ 、 100 nM 、 10 nM 、 1 nM 、 0.1 nM 、 0.01 nM 、又は 0.001 nM (例えば、 10^{-8} M 以下、例えば 10^{-8} M から 10^{-13} M 、例えば 10^{-9} M から 10^{-13} M) の解離定数 (K_d) を有している。

【0155】

一実施態様において、本発明による「 K_d 」又は「 K_d 値」は、目的の抗体の Fab バージョン及びその抗原を以下のアッセイに記載のように用いて実施される放射性標識抗原結合アッセイ (RIA) により測定される。Fab の抗体に対する溶液結合親和性は、Fab を、未標識抗原の滴定系列の存在下で、最小濃度の (^{125}I) 標識抗原に対して平衡化させ、次に、結合した抗原を抗 Fab 抗体被覆プレートにより捕捉することにより測定する (Chen ら、(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881)。上記アッセイのための条件を確立するために、マイクロタイタープレート (Dy nex) に、50 mM の炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中の $5 \mu\text{g/ml}$ の捕捉用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) を一晩被覆し、続いて、PBS 中の 2% (w/v) ウシ血清アルブミンで 2~5 時間室温 (およそ 23) にわたってブロックする。(例えば、Presta ら、(1997) Cancer Res. 57:4593-4599 における抗 VEGF 抗体の Fab - 12 の評価と一致して) 非吸着プレート (Nunc # 269620) にて、 100 pM 又は 26 pM の [^{125}I] 抗原を、目的の Fab の系列希釈物に混合する。次に、目的の Fab を一晩インキュベートする；しかし、このインキュベーションは、平衡に達することを確実にするために長時間 (例えば、約 65 時間) 継続してよい。その後、混合物を室温での (例えば、1 時間にわたる) インキュベーションのために捕捉プレートに移す。次に、この溶液を除去し、プレートを、PBS 中の 0.1% (Tween - 20 (登録商標)) で 8 回洗浄する。プレートが乾燥したときに、 $150 \mu\text{l}$ / ウェルのシンチラント (scintillant) (MicroScint - 20TM; Packard) を添加し、そのプレートを、TopcountTM ガンマカウンター (Packard) を用いて 10 分間にわたってカウントする。最大結合の 20% 以下を与える各 Fab の濃度を競合的結合アッセイに使用するために選択する。

30

40

【0156】

50

K_dは、B I A C O R E (登録商標) - 2 0 0 0 又はB I A C O R E (登録商標) - 3 0 0 0 (B I A c o r e , I n c . , P i s c a t a w a y , N J) を使用し、2 5 で固定化抗原C M 5 チップにより~ 1 0 応答単位(R U)で、表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。簡単に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(C M 5 , B I A C O R E I n c .) を、提供者の指示書に従ってN - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩(E D C) 及びN - ヒドロキシスクシンイミド(N H S) で活性化した。抗原を1 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 4 . 8 で5 μ g / m l (~ 0 . 2 μ M) に希釈し、結合したタンパク質の応答単位(R U)がおよそ1 0 になるように5 μ l / 分の流速で注入する。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入する。動力学的な測定のために、F a b の2 倍の段階希釈(0 . 7 8 n M から5 0 0 n M)を、2 5 で、およそ2 5 μ l / 分の流量で0 . 0 5 % ポリソルベート2 0 (T W E E N - 2 0 ^{T M}) 界面活性剤(P B S T)を含むP B S に注入する。会合センサーグラム及び解離センサーグラムを同時にフィットさせることによる単一対一ラングミュア結合モデル(s i m p l e o n e - t o - o n e L a n g m u i r b i n d i n g m o d e l) (B I A C O R E (登録商標) E v a l u a t i o n ソフトウェアバージョン3 . 2) を用いて、会合速度(k o n) と解離速度(k o f f) を算出する。平衡解離定数(K_d) をk o f f / k o n 比として算出する。例えば、Chenら、J. M o l. B i o l. 293 (1999) 865-881を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が1 0 6 M - 1 S - 1 を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(s t o p - f l o w e q u i p p e d s p e c t r o p h o m e t e r) (A v i v I n s t r u m e n t s) 又は攪拌キュベットを備えた80 0 0 シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、P B S (p H 7 . 2) 、2 5 の、2 0 n M の抗抗原抗体(F a b 型) の蛍光放出強度(励起 = 2 9 5 n m ; 放出 = 3 4 0 n m 、帯域通過 = 1 6 n m) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定されうる。

【0157】

2 . 抗体断片

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は、限定されないが、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂、F v、及びs c F v 断片、及び下記の他の断片を含む。所定の抗体断片の総説については、Hudsonら Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照。s c Fv断片の総説については、例えば、Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照; また、国際公開第93/16185号; 及び米国特許第5571894号及び第5587458号も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させたF a b 及びF (a b')₂ 断片の議論については、米国特許第5869046号を参照のこと。

【0158】

ダイアポディは2価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404097号; 国際公開第1993/01161号; Hudsonら, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)を参照。トリアポディ及びテトラポディもまたHudsonら, Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

【0159】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含んでいる抗体断片である。ある実施態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第6248516B1号を参照)。

【0160】

抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクトな抗体の分解、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による生産を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 1 】

3 . キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。所定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号、及び Morrison ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)) に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域) 及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【 0 1 6 2 】

ある実施態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR (又はその一部) が、非ヒト抗体から由来し、FR (又はその一部) がヒト抗体配列に由来する、一以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部をも含む。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、抗体特異性又は親和性を回復もしくは改善するために、非ヒト抗体 (例えば、HVR残基が由来する抗体) 由来の対応する残基で置換されている。

【 0 1 6 3 】

ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えば、Almagro及びFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に総説され、更に、Riechmann ら, Nature 332:323-329 (1988); Queen ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 米国特許第 5 8 2 1 3 3 7 号、同 7 5 2 7 7 9 1 号、同 6 9 8 2 3 2 1 号、及び同 7 0 8 7 4 0 9 号; Kashmiri ら, Methods 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR) グラフティングを記述); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) ("リサーフェシング"を記述); Dall'Acqua ら, Methods 36:43-60 (2005) ("FRシャッフリング"を記述); 及び Osbourn ら, Methods 36:61-68 (2005) 及び Klimka ら, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) ("FRのシャッフリングへの"誘導選択"アプローチを記述) に記載されている。

【 0 1 6 4 】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域 (例えば、Sims ら J. Immunol. 151:2296 (1993)); 軽鎖又は重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域 (例えば、Carter ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 及び Presta ら J. Immunol., 151:2623 (1993) を参照); ヒト成熟 (体細胞変異) フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008) を参照); 及び FR ライブラリースクリーニング由来のフレームワーク領域 (例えば、Baca ら, J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 及び Rosok ら, J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) を参照) を含む。

【 0 1 6 5 】

4 . ヒト抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的に van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) に記載されている。

【 0 1 6 6 】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するかもしくは動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含む。この

10

20

30

40

50

ようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)を参照。また、例えば、X E N O M O U S E T M 技術を記載している、米国特許第 6 0 7 5 1 8 1 号及び 6 1 5 0 5 8 4 号；H u M a b (登録商標)技術を記載している米国特許第 5 7 7 0 4 2 9 号；K - M M O U S E (登録商標)技術を記載している米国特許第 7 0 4 1 8 7 0 号及び、V e l o c i M o u s e (登録商標)技術を記載している米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 6 1 9 0 0 号)を参照。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

【 0 1 6 7 】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス - ヒトヘテロ細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur ら, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner ら, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)を参照。)ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第 7 1 8 9 8 2 6 号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト I g M 抗体の産生を記載している)及び Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)(ヒト - ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)もまた、Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 及び Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)に記載される。

【 0 1 6 8 】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択された F v クローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術が、以下に説明される。

【 0 1 6 9 】

5 . ライブラリー由来の抗体

本発明の抗体は、所望の活性又は活性(複数)を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、様々な方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom ら in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien ら編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)に総説され、更に、例えば、McCafferty ら, *Nature* 348:552-554; Clackson ら, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks ら, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks 及び Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu ら, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee ら, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 及び Lee ら, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。

【 0 1 7 0 】

所定のファージディスプレイ法において、V H 及び V L 遺伝子のレポーターがポリメラーゼ連鎖反応(P C R)により個別にクローニングされ、ファージライブラリーにランダムに再結合され、その後、Winter ら, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、通常、抗体断片を、単鎖 F v (s c F v)断片、又は F a b 断片のいずれかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性なしで免疫原に高親和性抗体を提供する。代わりに、Griffiths ら, *EMBO J*, 12: 725-734 (199

10

20

30

40

50

3)に記載されるように、ナイーブなレパートリーが、任意の免疫感作無しで、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対して、抗体の単一起源を提供するために、(例えば、ヒトから)クローン化することができる。最後に、ナイーブなライブラリーはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載されるように、非常に可変なCDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成するために、幹細胞由来の未転位V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用することにより合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報は、例えば、米国特許第5750373号、及び米国特許出願公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号及び第2009/0002360号を含む。

【0171】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書でヒト抗体又はヒト抗体の断片とみなされる。

【0172】

6. 多重特異性抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、従来の二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様において、結合特異性の一つはHER3に対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。ある実施態様において、二重特異性抗体は、HER3の2つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体はまたHER3を発現する細胞に対して細胞傷害性薬物を局在化させるために用いることができる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

【0173】

多重特異性抗体を作製するための技術は、限定されないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))、国際公開第93/08829号、及びTraunekerら, EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照)及び“knob-in-hole”エンジニアリング(例えば、米国特許第5731168号を参照)を含む。多重特異抗体はまた、抗体のFc-ヘテロ2量体分子を作成するための静電ステアリング効果を操作すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体又は断片を架橋すること(例えば米国特許第4676980号、及びBrennanら, Science, 229: 81 (1985)を参照)、二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelnyら, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照)、二重特異性抗体断片を作製するため、“ダイアボディ”技術を使用すること(例えば、Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)、単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用すること(例えば、Gruberら, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照)、及び、例えばTuttら J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作成することができる。

【0174】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を持つ改変抗体もまた本明細書に含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照)。

【0175】

本明細書中の抗体又は断片はまた、CD20並びにその他の異なる抗原(例えば米国特許出願公開第2008/0069820号参照)に結合する抗原結合部位を含む、「2重作用(Dual Acting)Fab」又は「DAF」を含む。そのような二重特異性HER3/EGFR阻害剤の例は、本明細書に記載されており、例示的なMEHD7945A抗体が含まれる。

【0176】

10

20

30

40

50

7. 抗体変異体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、又はペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

【0177】

10

a) 置換、挿入、及び欠失変異体

ある実施態様において、一つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異の対象となる部位は、HVR及びFRを含む。保存的置換は、表1の「保存的置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表1の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされた。

【0178】

表1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

アミノ酸は、共通の側鎖特性に基づくグループに分けられる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

【0179】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

【0180】

置換変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体など）の一以上の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的には、更なる研究のために選択され得られた変異体は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性を減少）を有し、及び/又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。典型的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載されるファージディスプレイベースの親和性成熟技術を用いて、簡便に生成され

50

得る。簡潔に言えば、一つ以上のHVR残基が変異し、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0181】

抗体親和性を改善するために、変化（例えば、置換）がHVRにおいてなされてもよい。このような変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異するコドンによってコードされる残基においてなされてもよく（例えば、Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196を参照されたい）、及び/又はSDR(a-CDR)においてなされてもよい。結果として生じた変種VH又は変種VLは結合親和性について試験される。二次ライブラリーからの構築及び再選択による親和性成熟は、例えば、Hoogenboom, H.R.ら、*Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37) 10において記載されている。親和性成熟のある態様において、任意の様々な方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド特異的変異誘発）によって成熟について選択された可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリーが作り出される。次いで、望ましい親和性を有する任意の抗体変種を特定するために、ライブラリーはスクリーニングされる。このアプローチでは、幾つかのHVR残基（例えば、一度に4～6個の残基）がランダム化される。抗原結合に關与するHVR残基を、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを用いて特異的に特定されてよい。特に、CDR-H3及びCDR-L3が標的化されることが多い。

【0182】

ある特定の態様において、置換、挿入、又は欠失は、このような変化によって抗体が抗原に結合する能力が実質的に低下しない限り、1つ又は複数のHVRの中にあってもよい。例えば、結合親和性を実質的に低下しない保存的变化（例えば、本明細書において提供されるような保存的置換）がHVRにおいてなされてもよい。このような変化はHVR「ホットスポット」又はSDRの外側にあってもよい。上記で提供される変種VH配列及びVL配列のある特定の態様において、それぞれのHVRは変化しないか、又は1個以下、2個以下、又は3個以下のアミノ酸置換を含有する。

【0183】

変異誘発のために標的化することができる、抗体の残基又は領域を特定するための有用な方法は、Cunningham, B.C., and Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085に記載のように「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法において、残基又は標的残基グループ（例えば、電荷のある残基、例えば、arg、asp、his、lys、及びglu）が特定され、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうか確かめるために、中性アミノ酸又は負電荷アミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）によって置換される。最初の置換に対して機能感受性を示したアミノ酸位置に、更なる置換が導入されることがある。または、もしくは更に、抗体と抗原との接触点を特定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造。このような接触残基及び隣接残基は、置換候補として標的化又は除去されることがある。変異体は、それらが所望の特性を含んでいるかどうかを決定するためにスクリーニングされてもよい。

【0184】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端又はC末端への融合（例えばADEPTの場合）、又は抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

【0185】

b) グリコシル化変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少するように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、一以上のグリコシル化部位が作成又は削除されるようにアミノ酸配列を変えることによって簡便に達成することができる。

10

20

30

40

50

【0186】

抗体がFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。哺乳動物細胞によって生成された天然型抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合により一般的に付着した分岐鎖、二分岐オリゴ糖を含んでいる。例えば、Wrightら、TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、二分岐糖鎖構造の「幹」のGlcNAcに結合した、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸、並びにフコースを含み得る。幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は一定の改善された特性を有する抗体変異型を作成するために行われ得る。

【0187】

一実施態様において、抗体変異体は、Fc領域に(直接又は間接的に)付着されたフコースを欠いた糖鎖構造を有して提供される。例えば、このような抗体のフコース量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、又は20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるAsn297に結合しているすべての糖構造の合計(例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造)に対して、Asn297の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域(Fc領域残基のEU番号付け)でおよそ297の位置に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297もまた位置297の上流又は下流のおよそ±3アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置294と300の間に配置され得る。このようなフコシル化変異体はADC機能を改善させている可能性がある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.); 米国特許出願公開第2004/0093621号(協和発酵工業株式会社)を参照。「フコース非修飾」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2002/0164328号、米国特許出願公開第2004/0093621号、米国特許出願公開第2004/0132140号、米国特許出願公開第2004/0110704号、米国特許出願公開第2004/0110282号、米国特許出願公開第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazakiら J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnukiら Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)が含まれる。非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLecl3 CHO細胞(Ripkaら Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)); 米国特許出願公開第2003/0157108A1号, Presta, L.; 及び国際公開第2004/056312A1号, Adamsら, 特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、アルファ-1、6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnukiら Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y.ら, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); 及び国際公開第2003/085107号を参照)を含む。

【0188】

抗体変異体が、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分オリゴ糖とともに更に与えられる。このような抗体変異体はフコシル化を減少させ、及び/又はADC機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairetら); 米国特許第6602684号(Umanaら); 及び米国特許出願公開第2005/0123546号(Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。このような抗体変異体はCDC機能を改善させた可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公

10

20

30

40

50

開第1997/30087号(Pateira); 国際公開第1998/58964号(Raju, S.); 及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

【0189】

c) Fc領域変異体

ある実施態様において、1つ又は複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つ又は複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域の配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含んでもよい。

10

【0190】

ある実施態様において、本発明は、インビボにおける抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能(例えば補体及びADCCなど)が不要又は有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を意図している。インビトロ及び/又はインビボでの細胞毒性アッセイを、CDC活性及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠くが(それゆえ、おそらくADCC活性を欠く)、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADCCを媒介する初代細胞のNK細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492の464ページの表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5500362号(例えばHellstrom, I.ら Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986))及びHellstrom, I.ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 米国特許第5821337号(Bruggemann, M.ら, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照)に説明される。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる(例えば、フローサイトメトリー用のACTITM非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は更に、目的の分子のADCC活性は、Clynesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、CDC活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施することができる(Gazzano-Santoroら, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S.ら, Blood 101:1045-1052 (2003); 並びにCragg, M.S.及びM.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照)。FcRn結合及びインビボでのクリアランス/半減期の測定は当該分野で公知の方法を用いても行うことができる(例えば、Petkova, S.B.ら, Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769を参照)。

20

30

40

【0191】

エフェクター機能が減少した抗体は、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327、329の一つ以上の置換を有するものが含まれる(米国特許第6737056号)。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる“DANA”Fc変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297及び327の2以上での置換を有するFc変異体を含む(米国特許第7332581号)。

【0192】

50

FcRへの改善又は減少させた結合を持つ特定の抗体変異体が記載されている。(例えば、米国特許第6737056号；国際公開第2004/056312号、及びShieldsら, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照)。

【0193】

所定の実施態様において、抗体変異体はADCCを改善する1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び/又は334における置換(EUの残基番号付け)を含む。

【0194】

幾つかの実施態様において、改変された(すなわち改善されたか減少した)C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害(CDC)を生じる、Fc領域における改変がなされ、例えば、米国特許第6194551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogieら J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に説明される。

【0195】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性IgGの移送を担う、新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善された抗体(Guyerら, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKimら, J. Immunol. 24:249 (1994))が、米国特許出願公開第2005/0014934A1号(Hintonら)に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する一つ又は複数の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域の残基の1以上の置換を有するものが含まれる: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434、例えば、Fc領域の残基434の置換(米国特許第7371826号)。

【0196】

Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5648260号; 米国特許第5624821号; 及び、Fc領域の変異体の他の例に関しては国際公開第94/29351号も参照のこと。

【0197】

d) システイン操作された抗体変異体

ある実施態様において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン改変抗体、例えば、「thioMAbs」を作成することが望まれ得る。特定の実施態様において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で起きる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中で更に記載されるように、イムノコンジュゲートを作成するために、例えば薬物部分又はリンカー-薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。ある実施態様において、一以上の以下の残基がシステインで置換され得る: 軽鎖のV205(Kabatの番号付け); 重鎖のA118(EU番号付け); 及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第7521541号に記載のように生成され得る。

【0198】

e) 抗体誘導体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手されている追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキソラン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(単独重合体又はランダム共重合体の何れか)及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニル

10

20

30

40

50

アルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性のために製造上の利点を有し得る。ポリマーは何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び/又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が特定の条件下で治療に使用されるのか等を考慮しながら決定することができる。

【0199】

その他の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱されてもよい抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが、提供される。一実施態様において、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである (Kamra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

10

【0200】

B. 組換え方法及び組成物

抗体は、組換え法及び組成物を使用して製造されてもよく、例えば米国特許第4816567号に記載されている。一実施態様において、本明細書に記載されている抗HER3抗体(二重特異性抗体を含む)をコードする単離核酸を提供する。このような核酸は、VLを含むアミノ酸配列及び/又は抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードしてもよい(例えば、抗体の軽及び/重鎖)。更なる実施態様において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる実施態様では、本発明の一又は複数のポリヌクレオチドを含む宿主細胞が提供される。このような一実施態様では、宿主細胞は:(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクターを含む(例えば、これらによって形質転換される)。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又はリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施態様において、本明細書に報告されるように複合体を作る方法が提供され、その方法は、上記のように、ポリペプチドの発現及び複合体の形成に適した条件下で、複合体のポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、及び必要に応じて、宿主細胞(又は宿主細胞培養培地)から複合体を回収することを含む。

20

30

【0201】

抗HER3抗体(二重特異性抗体を含む)の組換え生産のため、例えば、上述したように、抗体をコードする核酸を単離し、宿主細胞の更なるクローニング及び/又は発現のために1つ又は複数のベクターに挿入した。このような核酸は、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定することができる。

【0202】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に最適な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生されてよい。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、米国特許第5648237号、第5789199号、及び第5840523号を参照のこと。(また、大腸菌における抗体断片の発現を記述している Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254を参照のこと。)発現後、抗体を、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離されてよく、更に精製されうる。

40

【0203】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含む抗

50

体をコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が、「ヒト化」されており、部分的又は完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の生成をもたらす。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004); 及びLi et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照。

【0204】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併用されてもよく、特にヨウトガ細胞のトランスフェクションに使用されうる多くのバキュロウイルス株が同定されている。

【0205】

植物細胞培養物も宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号（トランスジェニック植物における抗体産生に関するPLANTIBODIESTM技術を記載）を参照。

【0206】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適応された哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) によって形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胚腎臓株 (Grahamら, J. Gen Virol. 36:59 (1977)に記載された293又は293細胞)；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)；マウスセルトリ細胞 (例えばMather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)に記載されたTM4細胞)；サル腎臓細胞 (CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA)；イヌ腎臓細胞 (MDCK；バッファローラット肝臓細胞 (BRL3A)；ヒト肺細胞 (W138)；ヒト肝臓細胞 (Hep G2)；マウス乳腺腫瘍 (MMT060562)；Matherら, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載されたようなTRI細胞；MRC5細胞；及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR-CHO細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；及びY0、NS0、及びSp2/0等の骨髓腫細胞株を含む。抗体生産のために適した哺乳動物宿主細胞株の概説には、Yazaki及びWu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), p255-268(2003)を参照。

【0207】

III. 診断方法

一つの局面において、本発明は、癌患者からの癌サンプル中のニューレグリン1 (NRG1) 発現を決定することを含む、癌患者のための治療を選択し、癌がNRG1を過剰発現した場合の治療にHER3阻害剤を選択する方法を提供する。

【0208】

別の局面において、本発明は、癌患者からの癌サンプル中のニューレグリン1 (NRG1) 発現を決定することを含む、癌患者のための治療を選択し、サンプルがNRG1を過剰発現した場合の治療としてHER3/EGFR阻害剤を選択する方法を提供する。

【0209】

一実施態様では、患者の癌は、この種類の癌におけるNRG1発現について中央値のレベルよりも高いレベルでNRG1を発現する。一実施態様において、高NRG1レベルとみなされるNRG1発現のレベルは、例えば、60パーセント以上、70パーセント以上、75パーセント以上、80パーセント以上、85パーセント以上、90パーセント以上、95パーセント以上、又はそれ以上（97パーセント以上）、である。発現レベルの中央値又はパーセントは、原則的にはNRG1発現の測定と同時に決定されうるか、又は事前に決定されていてもよい。

【0210】

特定の種類の癌では、NRG1発現は、この種類の癌に罹患している患者集団において二峰性である。二峰性の発現プロファイルは、高レベルのNRG1発現を示す患者のグル

10

20

30

40

50

ープ（過剰発現モード）、及び、より低いNRG1発現レベルを示す患者のグループ（過剰発現モードの欠如）から構成される。一実施態様において、2つのモード間の変曲点は、NRG1を過剰発現する癌であるか、又はNRG1の過剰発現を欠いている癌のいずれかであるか、癌の種類を特徴付けるための値として使用される。変曲点よりも高いNRG1発現レベルを有する癌は、NRG1を過剰発現する癌の種類として特徴付けられるであろう。変曲点よりも低いNRG1発現レベルを有する癌は、NRG1の過剰発現を欠いている癌の種類として特徴付けられるであろう。

【0211】

実施例4は、患者集団において、NRG1発現の分布を決定するためのアッセイを提供する。一実施態様において、二成分混合ガウス分布は、NRG1の過剰発現とNRG1の過剰発現の欠如との間の変曲点を推定するために使用される。

10

【0212】

二峰性のNRG1発現プロファイルを示すことが、本明細書に示されている癌の一例は、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）である。実施例4で説明したように、HNSCC癌の集団は、NRG1の過剰発現を有する癌及びNRG1過剰発現を欠如している癌のガウス二峰性分布プロファイルを示す。分布分析によって得られた変曲点は、対数目盛で約0.3689であり、線形目盛では約1.50に相当する。

【0213】

一実施態様において、NRG1を過剰発現する癌はまた、ニューレグリン誘導性のオートクリングナル伝達を示す。ニューレグリン誘導性のオートクリングナル伝達を示す癌は癌細胞におけるNRG1及びHER3の共発現の有無によって同定される。NRG1及びHER3の共発現は、例えば、RNAインサイツハイブリダイゼーション法により、測定しうる。

20

【0214】

また、本明細書で提供されるものは、サンプル中のNRG1の発現レベルを決定し、サンプル中の1つ又は複数のリファレンス遺伝子の発現レベルに対するサンプル中のNRG1の発現レベルを定量することを含む、癌サンプル中のNRG1発現レベルを定量する方法である。好適なリファレンス遺伝子としては、AL-137727、VPS33B、GAPDH、SDHA、SP2、GUSBが含まれる。一実施態様では、癌サンプル中のNRG1発現レベルの定量方法は、サンプル中のNRG1の発現レベルを決定すること、及びサンプル中のAL-137727（配列番号：10、配列番号：11）及びVPS33B（配列番号：12）の一方又は両方の発現レベルと比較し、サンプル中のNRG1の発現レベルを定量することを含む。一実施態様において、サンプル中のNRG1の発現レベルは、AL-137727の発現レベルと比較して定量する。一実施態様において、サンプル中のNRG1の発現レベルは、VPS33Bの発現レベルと比較して定量する。一実施態様において、サンプル中のNRG1の発現レベルは、サンプル中のAL-137727とVPS33Bの両方の発現レベルと比較して定量する。一実施態様において、NRG1発現レベルは、AL-137727及びVPS33Bの発現レベルの平均を使用して、デルタCt法を用いて計算される。NRG1発現を定量する方法は、患者に対する治療を選択する目的でNRG1発現を比較するため、又は治療に対する患者の応答を予測するための信頼性の高い基準を提供する。

30

40

【0215】

以下に記載の治療方法の前に、患者の癌におけるNRG1発現レベル（単数又は複数）を評価する。一般に生物学的サンプルは、治療が必要な患者から得て、このサンプルを1つ以上の診断アッセイ（単数又は複数）、通常は少なくとも1つのインビトロ診断（IVD）アッセイに供する。しかし、NRG1発現を評価する他の形態、例えば、インビボ診断が本明細書に明示的に考慮される。

【0216】

生物学的サンプルは、例えば、腫瘍サンプル、血液サンプル、痰サンプル、尿サンプル、もしくは、患者から取り出さる他の組織又は体液である。幾つかの実施態様において、

50

生物学的サンプルは、固定サンプル、例えば、ホルマリン固定、パラフィン包埋（FFPE）サンプル、又は凍結サンプルである。特定の実施態様において、NRG1の発現レベルは、インサイト決定される。

【0217】

mRNA又はタンパク質の発現を決定するための様々方法としては、限定されないが、遺伝子発現プロファイリング、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）を含むポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、マイクロアレイ解析、遺伝子発現の連続分析、マスアレイ（MassARRAY）、Massive1 Parallel Signature Sequencing（超並列シグネチャー配列決定）（MPSS）、プロテオミクス、免疫組織化学（IHC）、直接RNA配列決定、質量分析法、ELISA法による遺伝子発現解析などを含む。好ましくmRNAが定量化される。そのようなmRNA解析は、好ましくは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の技術を使用して、又はマイクロアレイ分析により実行される。PCR法を用いる場合、PCRの好ましい形態は、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）である。好適な定量的リアルタイムPCRアッセイは、以下の実施例1に記載されるとおりである。

10

【0218】

RNA源として固定された、パラフィン包埋組織を用い、mRNAの単離、精製、プライマー伸長及び増幅を含む、遺伝子発現のプロファイリングのための代表的なプロトコル工程が、様々な出版された雑誌の記事に記載されている（例えば：Godfreyら、J. Mol. Diagn. 2: 84-91 (2000); Spechtら、Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)）。簡単に言えば、代表的なプロセスは、パラフィン包埋腫瘍組織サンプルの10マイクログラム厚切片の切断から始まる。RNAを抽出し、タンパク質やDNAが除去される。RNA濃度を分析した後、RNAの修復及び/又は増幅ステップが必要に応じて含まれ得、RNAは遺伝子特異的プロモーターを用いて転写され、PCRが続く。最後に、データを解析して、検査された腫瘍サンプルで同定された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて、患者に利用できる最善の治療選択肢（単数又は複数）を特定する。

20

【0219】

遺伝子発現を決定するための様々な例示的な方法を詳細に説明する。

【0220】

(i) 遺伝子発現プロファイリング

一般に、遺伝子発現プロファイリングの方法は、二つの大きなグループに分けることができる：ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション解析に基づく方法と、生化学的検出又はポリヌクレオチドの配列決定に基づく他の方法である。試料中のmRNA発現を定量化するために当該分野で最も広く用いられている方法には、ノーザンブロット及びインサイトハイブリダイゼーション（Parker及びBarnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283(1999); RNAse保護アッセイ（Hod, Biotechniques 13: 852-854(1992); 及び逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）（Weisら, Trends in Genetics 8: 263-264(1992)）が含まれる。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二重鎖又はDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識できる抗体を用いてもよい。配列ベースの遺伝子発現解析の代表的な方法には、連続遺伝子発現解析（SAGE）、及びMassive1 Parallel Signature Sequencing（MPSS）による遺伝子発現解析、及びRNAの直接配列決定を含む。

30

40

【0221】

(ii) ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

上に列挙した技術のうち、最も感度が良く最も柔軟性がある定量法はPCRであり、これは、正常組織及び腫瘍組織中の異なった試料集団におけるmRNAレベルを、薬剤処置を含むか又は含まずに、比較し、遺伝子発現のパターンを特徴付けし、密接に関連したmRNA間を識別し、RNA構造を解析するために使用することができる。

【0222】

第一工程は標的試料からのmRNAの単離である。出発材料は典型的には、ヒト腫瘍又

50

は腫瘍細胞株、及び対応する正常組織又は細胞株から単離された全RNAである。したがって、RNAは、乳房、肺、大腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、子宮、等を含む様々な原発腫瘍、腫瘍又は腫瘍細胞株から、健常者ドナー由来のプールされたDNAとともに単離することができる。mRNAの供給源が原発腫瘍の場合、mRNAは凍結又はパラフィン包埋されて保存され及び固定された（例えば、ホルマリン固定）組織試料から、例えば、抽出することができる。mRNA抽出に関する一般的な方法は当該分野で良く知られており、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)を含む分子生物学の標準的教科書に開示されている。パラフィン包埋組織からRNA抽出の方法は、例えば、Rupp and Locker, Lab Invest. 56:A67 (1987), and De Andres ら、BioTechniques 18:42044 (1995)に開示されている。特に、RNAの単離は、Qiagen等の商業的製造者の精製キット、バッファセット及びプロテアーゼを、製造者の説明書に従って使用することで実施することができる。例えば、培養液中の細胞からの全RNAは、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離できる。他の市販のRNA分離キットには、MASTER PURE（登録商標）完全DNA及びRNA精製キット（Complete DNA and RNA Purification Kit）（EPICENTRE（登録商標）、Madison, Wis.）、及びパラフィンブロックRNA単離キット（Paraffin Block RNA Isolation Kit）（Ambion, Inc.）を含む。組織試料からの全RNAは、RNA Stat-60（Tel-Test）を使用して単離できる。腫瘍から調製したRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離できる。

【0223】

RNAはPCRのテンプレートとならないので、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングの最初のステップはRNAテンプレートのcDNAへの逆転写と、それに続くPCR反応でのその指数関数的な増幅である。2つの最も広く用いられている逆転写酵素はトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（AMV-RT）及びモロニー Maus 白血球ウイルス逆転写酵素（MMLV-RT）である。逆転写段階は、典型的には、発現プロファイリングの環境及び目的に依存し、特異的プライマー、ランダムヘキサマー、又はオリゴdTプライマーを使用してプライムされる。例えば、製造者説明書に従い、GENE AMPTM RNA PCRキット（Perkin Elmer, Calif., USA）を使用して抽出RNAを逆転写することができる。誘導したcDNAは、ついで、後のPCR反応のテンプレートとして使用できる。PCR工程では、様々な熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼを使用することができるが、典型的には、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するが3'-5'ブルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠くTaq DNAポリメラーゼを用いる。よって、TAQMAN（登録商標）PCRでは、典型的には、Taq又はTthポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性を用いて、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、5'ヌクレアーゼ活性と同等の任意の酵素を用いることができる。PCR反応にとって典型的なアンプリコンを生成するために2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。三番目のオリゴヌクレオチド、又はプローブを、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するために設計する。該プローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長せず、レポーター蛍光色素及び消光蛍光色素で標識される。このレポーター色素のどんなレーザー誘導放射も、プローブ上でこの2つの色素が近接して位置している場合には、消光色素によって消光する。増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、テンプレートに依存する形でプローブを切断する。生じたプローブ断片は溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルは、二番目のフルオロフォアの消光効果とは無関係である。新しい分子が合成される度にレポーター色素の1分子が遊離させられ、消光しないレポーター色素の検出がデータの定量的な解釈の基礎を提供する。

【0224】

TAQMAN（登録商標）PCRは、例えば、ABI PRIZM 7700（商品名）Sequence Detection System（登録商標）（Perkin-El

mer - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、又は Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 等の商業的に入手可能な装置を使用しておこなうことができる。好ましい実施態様では、5'ヌクレアーゼ手法は、ABI PRIZM 7700 (登録商標) Sequence Detection System等のリアルタイム定量PCR装置ですすめられる。該システムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)、カメラ及びコンピューターからなる。該システムでは、サーモサイクラー上の96-ウェルフォーマットで試料を増幅する。増幅の間、96ウェル全てに関する光ファイバーケーブルを通してレーザー励起した蛍光シグナルがリアルタイムで収集され、CCDカメラで検出される。該システムは、装置を作動し、データを分析するソフトウェアを含む。

10

【0225】

5'-ヌクレアーゼアッセイのデータは、Ct又は閾値サイクルとして最初に表される。上で検討したように、蛍光値は毎サイクルの間に記録され、増幅反応においてそのポイントまでに増幅した産物の量を表す。蛍光シグナルが統計的に有意であるとして最初に記録されたポイントが閾値サイクル(Ct)である。

【0226】

エラー及び試料と試料間の変化による効果を最小限にするために、通常は内部標準を使用してPCRを実施する。理想的な内部標準は、異なる組織間では一定のレベルで発現し、実験上の処理によって影響を受けない。遺伝子発現のパターンを正規化するために最も頻繁に使用されているRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ(GAPDH)及びP-アクチンのmRNAである。

20

【0227】

PCR技術のより最近の変形例は、二重標識蛍光発生プローブ(つまり、TAQMAN(登録商標)プローブ)によってPCR産物の蓄積を測定する定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)である。リアルタイムPCRは、各標的配列に対する内部競合体が正規化のために使用される定量的競合PCRと、試料内に含まれる正規化遺伝子、又はPCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用する定量的比較PCRの双方に匹敵する。更なる詳細については、例えばHeldら、Genome Research 6:986-994 (1996)を参照のこと。

【0228】

RNA源として固定された、パラフィン包埋組織を用い、mRNAの単離、精製、プライマー伸長及び増幅を含む、遺伝子発現のプロファイリングのための代表的なプロトコール工程が、様々な出版された雑誌の記事に記載されている(例えば: Godfreyら、J. Mol. Diagn. 2: 84-91 (2000); Spechtら、Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001))。簡単に言えば、代表的なプロセスは、パラフィン包埋腫瘍組織サンプルの10マイクログラム厚切片の切断から始まる。RNAを抽出し、タンパク質やDNAが除去される。RNA濃度を分析した後、RNAの修復及び/又は増幅ステップが必要に応じて含まれ、RNAは遺伝子特異的プロモーターを用いて転写され、PCRが続く。

30

【0229】

本発明の一面によれば、増幅される遺伝子中に存在するイントロン配列に基づいてPCRプライマー及びプローブが設計される。この実施態様では、プライマー/プローブ設計の第一工程は遺伝子内のイントロン配列の描写である。これは、公に入手可能なソフトウェア、例えばKent, W.J., Genome Res. 12(4):656-64 (2002)によって開発されたDNABLASTソフトウェア、あるいはその変形形を含むBLASTソフトウェアによって行うことができる。PCRプライマー及びプローブ設計の十分に確立された方法が次の工程として続く。

40

【0230】

非特異的シグナルを避けるために、プライマーとプローブを設計する場合、イントロン内において反復配列をマスクすることが重要である。これは、反復エレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、反復エレメントがマスクされる問い合わせ

50

配列を返すベイヤー医科大学からオンラインで入手可能な Repeat Masker プログラムを使用して容易に達成することができる。ついで、マスクされたイントロン配列を使用し、例えば Primer Express (Applied Biosystems) ; MGB アッセイ - パイ - デザイン (Applied Biosystems) ; プライマー 3 (Rozen 及び Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S 編 Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386) のような任意の商業的に又は他の好適に入手できるプライマー / プロブ設計パッケージを使用して、プライマー及びプロブ配列を設計することができる。

【 0 2 3 1 】

PCR プライマー設計で考慮される因子は、プライマー長、融解温度 (T_m)、及び G / C 含有量、特異性、相補的プライマー配列、及び 3' 末端配列を含む。一般に、最適な PCR プライマーは、一般に 17 - 30 塩基長であり、約 20 - 80 %、例えば約 50 - 60 % の G + C 塩基を含む。50 から 80 の間、例えば約 50 から 70 の T_m が典型的には好ましい。

【 0 2 3 2 】

PCR プライマー及びプロブ設計のための更なる指針については、その開示全体が出典明示によりここに明示的に援用される例えば Dieffenbach ら, "General Concepts for PCR Primer Design" in: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155 ; Innis 及び Gelfand, "Optimization of PCRs" in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11 ; 及び Plasterer, T.N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520-527 (1997) を参照のこと。

【 0 2 3 3 】

好適な条件、プライマー、プロブ、及び内部標準 (G6PDH) は、以下の実施例 1 に記載したとおりである。

【 0 2 3 4 】

(i i i) マイクロアレイ

ディファレンシャル遺伝子発現も、マイクロアレイ技術を用いて同定し、又は確かめることができる。よって、乳癌関連遺伝子の発現プロファイルを、マイクロアレイ技術を使用して新鮮組織又はパラフィン包埋組織の何れかで測定することができる。この方法では、興味あるポリヌクレオチド配列 (cDNA 及びオリゴヌクレオチドを含む) をマイクロチップ基板上にプレートし、整列させる。ついで、この整列させた配列を、興味ある細胞又は組織からの特異的 DNA プロブでハイブリダイズする。丁度 PCR 法のように、mRNA のソースは、典型的にはヒト腫瘍又は腫瘍細胞株及び対応する正常な組織又は細胞株からの全 RNA である。したがって RNA は様々な原発腫瘍又は腫瘍細胞株から単離することができる。mRNA の供給源が原発腫瘍の場合、mRNA は、毎日の臨床の現場で日常的に調製され保持される凍結又はパラフィン包埋されて保存され及び固定された (例えば、ホルマリン固定) 組織試料から、例えば、抽出することができる。

【 0 2 3 5 】

マイクロアレイ技術の特定の実施態様では、cDNA クローンの PCR 増幅挿入部分を高密度アレイの基板へ塗布する。好ましくは、少なくとも 10000 のヌクレオチド配列を基板へ塗布する。それぞれ 10000 エlement がマイクロチップ上に固定化された、マイクロアレイ遺伝子は、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションに適している。蛍光標識 cDNA プロブは、興味ある組織から抽出した RNA の逆転写によって蛍光ヌクレオチドを取り込むことで作製できる。チップへ塗布した標識 cDNA プロブは、アレイ上の各スポットの DNA と特異性をもってハイブリダイズする。非特異的に結合したプロブを除くためにストリンジェントに洗浄した後、チップを共焦点レーザー顕微鏡によって又は CCD カメラのような他の検出法によってスキャンする。各整列した Element のハイブリダイゼーションの定量化によって、対応する mRNA 発生量の評価

10

20

30

40

50

が可能となる。二色蛍光によって、2つのソースのRNAから作製した別々の標識cDNAプローブを2つ1組でアレイへハイブリダイズする。したがって、各特定の遺伝子に対応する2つのソースからの転写物の相対発生量が、同時に決定される。小型化したハイブリダイゼーションのスケールによって、非常に多くの遺伝子に関する発現パターンの簡便で迅速な評価が可能となる。このような方法が、細胞当たり少しのコピーが発現する希な転写物の検出するため、また発現レベルにおける少なくともおよそ2倍の違いを再現可能に検出するために必要とされる感度を有していることが示されている (Schenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2): 106-49(1996))。マイクロアレイ解析は、製造者のプロトコールに従って、例えばAffymetrix GENCHIP™技術、又はIncyteのマイクロアレイ技術を使用することによって、市販の装置によって実施することができる。

10

【0236】

遺伝子発現の大規模解析のためのマイクロアレイ法の開発により、様々な腫瘍のタイプにおいて、癌の分類と予後予測の分子マーカーについて体系的に探索することが可能となる。

【0237】

(iv) 遺伝子発現連続解析 (SAGE)

遺伝子発現連続解析 (SAGE) は、各転写物に対して個々のハイブリダイゼーションプローブを提供することを要せず、多数の遺伝子転写物の同時の定量解析を可能にせしめる方法である。まず、タグが各転写物内の独特の位置から得られるとの前提で、転写物をユニークに同定するのに十分な情報を含む短い配列タグ (約10 - 14 bp) が生成される。ついで、多くの転写物を互いに結合させて長い連続の分子を形成し、これを配列決定して、複数タグの同一性を同時に明らかにすることができる。転写物の任意の集団の発現パターンは、個々のタグの存在量を決定し、各タグに対応する遺伝子を同定することによって定量的に評価することができる。更なる詳細については、例えばVelculescuら, Science 270:484-487 (1995); 及びVelculescuら, Cell 88:243-51 (1997)を参照のこと。

20

【0238】

(v) Mass ARRAY 技術

Mass ARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) の技術は、検出用質量分析 (MS) を用いた遺伝子発現解析の自動化したハイスループットな方法である。この方法によれば、RNAの単離、逆転写及びPCR増幅の後に、cDNAがプライマー伸長に供される。cDNA由来のプライマー伸長産物を精製し、MALDI-TOF MSのサンプル調製に必要な成分があらかじめロードされているチップアレイ上に分配される。反応物に存在する様々なcDNAが、得られた質量スペクトルのピーク面積を分析することによって定量される。

30

【0239】

(vi) Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) による遺伝子発現解析

Brennerら、Nature Biotechnology 18:630-634(2000)に記載されているこの方法は、非ゲル系シグネチャー配列解析を、直径5 µgの別々のマイクロビーズ上での数百万のテンプレートのインビトロクローニングと組合せた配列解析アプローチである。最初に、DNAテンプレートのマイクロビーズライブラリーをインビトロでのクローニングにより構築する。これに続いて、フローセル中にテンプレート含有マイクロビーズの平面アレイを高密度 (代表的には3 × 10⁶ マイクロビーズ / cm² を超える) でアセンブリする。DNA断片の分離を要さない蛍光系シグネチャー配列解析法を用いて、各マイクロビーズ上のクローニングされたテンプレートの自由端を同時に分析する。この方法では、1回の操作で酵母cDNAライブラリーから数十万の遺伝子シグネチャー配列を同時にかつ正確に提供することが示されている。

40

【0240】

(vii) 免疫組織化学法

50

免疫組織化学法はまた本発明の予後マーカーの発現レベルを検出するのに適している。よって、抗体又は抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、最も好ましくは各マーカーに特異的なモノクローナル抗体が発現の検出に使用される。抗体は、例えば、放射標識、蛍光標識、例えばビオチン等のハプテン標識、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼのような酵素によって、検出することができる。あるいは、未標識一次抗体が、抗血清、ポリクローナル抗血清又は一次抗体に特異的なモノクローナル抗体を含む、標識二次抗体との関連で使用される。免疫組織化学プロトコール及びキットは当該分野でよく知られており、商業的に入手可能である。

【0241】

(viii) プロテオミクス

「プロテーム」なる用語は、ある時点でのサンプル（例えば組織、生物、又は細胞培養物）中に存在するタンパク質の全体として定義される。プロテオミクスは、とりわけ、サンプル中のタンパク質発現の網羅的变化の研究を含む（「発現プロテオミクス」とも称される）。プロテオミクスは典型的には次の工程を含む：（1）2-Dゲル電気泳動（2-D PAGE）によるサンプル中の個々のタンパク質の分離；（2）例えば質量スペクトル又はN末端配列決定によるゲルから回収された個々のタンパク質の同定、及び（3）バイオインフォマティクスを使用するデータ解析。プロテオミクス法は、遺伝子発現プロファイリングの他の方法に対する貴重な補充手段であり、単独で又は他の方法と組み合わせて、本発明のマーカーの産物を検出するために使用することができる。

【0242】

(ix) 直接RNA配列決定

直接RNA配列決定（DSR）は、事前のcDNAの合成又はライゲーション/増幅の工程を必要とせずに、直接、RNA分子の超並列配列決定を可能にする。Ozsolakら、*Nature* 461:814-818 (2009)；Ozsolak F, 及びMilos PM., *WIREs RNA*, 2: 565-570 (2011)、Ozsolak F, 及びMilos PM., *Experimental Medicine* 28: 2574-2580。この技術は、ホルマリン固定パラフィン包埋を含め、RNAサンプルの定量化及び分析を可能にした。

【0243】

一般的に、単離された全RNA又は細胞溶解物を、ポリA RNA種の捕捉及び配列決定を可能にするポリ(dT)をコーティングされたフローセルに追加される。ポリAポリメラーゼは、天然のポリAテールを含有しないRNA種について、配列決定のためにフローセルにサンプルをロードする前にポリAテールを生成するために使用される。

【0244】

(x) RNAインサイツハイブリダイゼーション

RNAインサイツハイブリダイゼーションは、組織サンプル中のmRNA発現の検査に用いられる技術である。Veeck J and Dahl E., *Methods Mol Biol.*, 664:135-50 (2010)；Nuovo GJ., *Methods*, 44:39-46 (2008)；Yamada H., *Cytometry A.*, 77:1032-7 2010。

【0245】

一般的に、目的とするRNAに特異的なプローブは、放射性タグ、酵素プローブ、化学染料又は蛍光化合物などの、検出可能な標識で標識される。目的とする組織サンプルは、プローブが細胞中の相補的RNA配列にハイブリダイズすることを可能にする条件下で、一本鎖標識プローブの溶液と接触させる。任意のハイブリダイズしていないプローブを除去し、ハイブリダイズしたプローブを適切な方法により検出する。

【0246】

(xi) mRNAの単離、精製、及び増幅の一般的な記述

RNA源として固定された、パラフィン包埋組織を用い、mRNAの単離、精製、プライマー伸長及び増幅を含む、遺伝子発現のプロファイリングのための代表的なプロトコール工程が、様々な出版された雑誌の記事に記載されている（例えば、Godfreyら、*J. Mol. Diagn.* 2: 84-91 (2000)；Spechtら、*Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)）。簡単に言えば、代表的なプロセスは、パラフィン包埋腫瘍組織サンプルの10マイクログラム厚切片の切断から始まる。RNAを抽出し、タンパク質やDNAが除去される。R

10

20

30

40

50

RNA濃度を分析した後、RNAの修復及び/又は増幅ステップが必要に応じて含まれ得、RNAは遺伝子特異的プロモーターを用いて転写され、PCRが続く。最後に、データを解析して、検査された腫瘍サンプルで同定された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて患者に利用できる最良の治療選択肢(単数又は複数)を特定する。

【0247】

NRG1の発現はまた、インビボでの診断アッセイを使用して、例えば、検出されるべき分子に結合し検出可能なラベル(例えば、放射性同位元素など)でタグ付けされた分子(例えば抗体)を投与し、そのラベルの局在化について患者を外部からスキャンすることにより評価することができる。

【0248】

IV. 薬学的製剤

本発明に従って使用される、二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤の治療的製剤は、所望の程度の純度を有する抗体と任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA (1980))とを、一般的には凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で混合することによって調製される。抗体の結晶も考えられている(米国特許出願2002/0136719参照)。薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、使用される投薬量及び濃度でレシipientに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝液;アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤;防腐剤(例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロライド;ヘキサメトニウムクロライド;塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;及びm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン;マンノサッカライド、ジサッカライド、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物;キレート剤、例えば、EDTA;糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール;塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体);及び/又はTWEENTM、PLURONICTM又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。凍結乾燥抗体製剤は、参照により本明細書に明示的に援用される国際公開第97/04801号に記載されている。

【0249】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性化化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。HER3阻害剤と組み合わせることのできる様々な薬物は、下記の方法の節に記載されている。そのような分子は、適切には、意図された目的に有効な量で組み合わせられて存在する。

【0250】

また、活性成分は、例としてコアセルベーション技術又は界面重合法により調製したマイクロカプセル、例として、それぞれ、コロイド薬物送達系(例えばリポソーム、アルブミン微小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)において又はマクロエマルジョンにおいて、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに包含してよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示される。

【0251】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスが成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形をしている。徐放性マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロ

10

20

30

40

50

ゲル（例えば、ポリ(メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第 3 7 7 3 9 1 9 号)、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア)などの分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0252】

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、容易に達成することができる。

【0253】

したがって、二重特異性 HER3 / EGFR 阻害剤などの HER3 阻害剤（例えば MHD7945A）、又はその薬学的組成物を製造するための方法が提供され、この方法は、パッケージ中に阻害剤又はその薬学的組成物と、阻害剤に応答しうるタイプの癌（例えば、HNSCC）を有する患者を治療することについて、この阻害剤又は薬学的組成物が指示されることを記載している表示とを、備えており、これは、この患者の癌が、この種類の癌における NRG1 発現について、中央値のレベルよりも高いレベルで NRG1 を発現する。

【0254】

更に、化学療法剤又はその薬学的組成物を製造するための方法が提供され、この方法は、パッケージ中に化学療法剤又はその薬学的組成物と、ある種類の癌を有する患者を治療することについてこの化学療法剤又は薬学的組成物が指示されることを記載している表示とを、組み合わせて備えており、ここで、この患者の癌が、この種類の癌における NRG1 発現について、中央値のレベルよりも高いレベルで NRG1 を発現する。

【0255】

V. HER3 阻害剤を用いた治療

本発明は、本明細書において、患者が HER3 阻害剤の投与前に NRG1 を過剰発現する癌のタイプと診断されたことを特徴とする、患者に、二重特異性 HER3 / EGFR 阻害剤などの HER3 阻害剤の治療的有効量を投与することを含む、癌患者を治療する方法を提供する。

【0256】

一実施態様において、NRG1 の過剰発現の診断は、患者の癌が、この種類の癌における NRG1 発現について、中央値のレベルよりも高いレベルで NRG1 を発現するかという決定に基づくものであった。特定の実施態様において、患者の癌は、この種類の癌における NRG1 発現について、60、70、75、80、85、90、95、97 パーセントイル以上のレベルで NRG1 を発現する。

【0257】

特定の癌の種類において、NRG1 発現は、この種類の癌に罹患している患者集団で二峰性である。二峰性の発現プロファイルは、高レベルの NRG1 発現を示す患者のグループ（過剰発現モード）、及び、より低い NRG1 発現レベルを示す患者のグループ（過剰発現モードの欠如）から構成される。一実施態様において、2つのモード間の変曲点は、NRG1 を過剰発現する癌であるか、又は NRG1 の過剰発現を欠いている癌のいずれかであるか、癌の種類を特徴付けるための値として使用される。変曲点よりも高い NRG1 発現レベルを有する癌は、NRG1 を過剰発現する癌の種類として特徴付けられるであろう。変曲点よりも低い NRG1 発現レベルを有する癌は、NRG1 の過剰発現を欠いている癌の種類として特徴付けられるであろう。したがって、一実施態様において、NRG1 の過剰発現の診断は、患者の癌が二峰性の NRG1 発現プロファイルの過剰発現モードに該当するとの判定に基づいていた。

【0258】

実施例 4 は、患者集団において、NRG1 発現の分布を決定するためのアッセイを提供する。一実施態様において、二成分混合ガウス分布は、NRG1 の過剰発現と NRG1 の

10

20

30

40

50

過剰発現の欠如との間の変曲点を推定するために使用される。

【0259】

一実施態様において、治療されるべき癌は、二峰性のNRG1発現プロファイルを示す。そのような癌の一例は、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)である。実施例4で説明したように、HNSCC癌の集団は、NRG1の過剰発現を有する癌及びNRG1過剰発現を欠如している癌のガウス二峰性分布プロファイルを示す。分布分析によって得られた変曲点は、対数目盛で約0.3689であり、線形目盛では約1.50に相当する。

【0260】

一実施態様において、治療されるべき癌は、ニューレグリン誘導性のオートクリンシグナル伝達を示す。このような癌は、癌細胞におけるNRG1及びHER3の共発現の有無によって同定しうる。NRG1及びHER3の共発現は、例えば、RNAインサイツハイブリダイゼーション法により、測定しうる。

10

【0261】

一実施態様において、本発明は、MEHD7945Aの投与前に、NRG1を過剰発現する種類の癌と診断された患者にMEHD7945Aの治療有効量を投与することを含む、癌患者を治療するための方法を提供する。一実施態様において、癌は、ニューレグリン誘導性のオートクリンシグナル伝達を示す。一実施態様において、癌は、二峰性のNRG1の発現プロファイルを示す。

【0262】

一実施態様において、本発明は、MEHD7945Aの投与前に、NRG1を過剰発現する種類の癌と診断された患者にMEHD7945Aの治療有効量を投与することを含む、扁平上皮癌患者を治療するための方法を提供する。一実施態様において、扁平上皮癌は、ニューレグリン誘導性のオートクリンシグナル伝達を示す。一実施態様では、扁平上皮癌は、二峰性のNRG1発現プロファイルを示す。

20

【0263】

一実施態様において、本発明は、MEHD7945Aの投与前に、NRG1を過剰発現する種類のHNSCCと診断された患者にMEHD7945Aの治療有効量を投与することを含む、HNSCC患者を治療するための方法を提供する。

【0264】

二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤を用いた治療は、好ましくは、無増悪生存期間(PFS)及び/又は全生存期間(OS)を含む、生存を延長する。一実施態様では、二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤を用いた治療は、認可された抗腫瘍剤を投与すること、又は治療される癌についての診療基準によって実現される生存よりも、少なくとも約20%生存を延長する。

30

【0265】

患者は、進行性、難治性、再発性、化学療法抵抗性、及び/又はEGFR阻害剤耐性癌を有する場合がある。患者へのMEHD7945AのHER3阻害剤の投与は、例えばこのような患者にEGFR阻害剤治療を投与することによって実現される生存よりも少なくとも約20%生存を延長し得る。

【0266】

二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤を、例えばボラスとして、もしくはある時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路などの周知の方法によって、ヒト患者に投与する。抗体の静脈内投与が好ましい。

40

【0267】

癌の予防又は治療のため、二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤の用量は、上記で定義したように、治療される癌の種類、癌の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、前治療歴、患者の既往歴及びその薬物に対する応答性、並びに担当医師の判断に依存する。

【0268】

50

一実施態様では、固定（一定）用量の阻害剤が投与される。この固定用量は、適切には1回で、又は連続した処置で患者に投与されてもよい。固定用量が投与される場合、好ましくはその固定用量は約20mgから約2000mgという阻害剤の範囲である。例えば、その固定用量は約420mg、約525mg、約840mg、又は約1050mgという阻害剤、例えばベルツズマブであってもよい。

【0269】

一連の投薬が行われる場合、これらは、例えばおよそ毎週、およそ隔週、およそ3週間毎、又はおよそ4週間毎に投与されてもよいが、好ましくはおよそ3週間毎に投与される。例えば疾患が進行するまで、有害事象まで、又は医師によって決定されるその他の時点まで、この固定用量を投与し続けてもよい。例えば、約2、3、又は4から最大約17回以上の固定用量を投与してもよい。

10

【0270】

一実施態様では、抗体の1回以上のローディング用量（単数又は複数）に続いて、その抗体の1回以上の維持用量（単数又は複数）を投与する。別の実施態様では、患者に同用量を複数回投与する。

【0271】

二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤は、単一抗腫瘍剤として投与してもよいが、患者は場合によりこの阻害剤（又は化学療法剤）と、1つ以上の（追加の）化学療法剤（単数又は複数）との組み合わせで処置される。本明細書における例示的な化学療法剤としては、イリノテカン、ゲムシタピン、カルボプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル、トポテカン、及び/又はリボソームのドキシソルピシンが挙げられる。併用投与は、共投与又は同時投与を含み、別々の製剤か又は単一の薬学的製剤、及び何れかの順番による連続投与を用い、好ましくは両方（又は全て）の活性薬剤（医薬）が同時にその生物学的活性を発揮する期間がある。このように、代謝拮抗化学療法剤を、阻害剤の投与前に投与しても、又は投与後に投与してもよい。この実施態様では、代謝拮抗化学療法剤の少なくとも1回の投与、及び阻害剤の少なくとも1回の投与との間のタイミングは、好ましくは約1か月以下であり、最も好ましくは約2週間以下である。又は、代謝拮抗化学療法剤及び阻害剤は、単一の処方物又は別々の処方物の形で患者に同時投与される。化学療法剤と阻害剤との組み合わせを用いた治療により、患者に対して相乗的な、即ち相加的よりも大きな治療上の利益が生じ得る。

20

30

【0272】

代謝拮抗化学療法剤は、投与される場合、それについての周知の投薬量で通常投与されるか、又は必要に応じて、代謝拮抗化学療法剤の投与に起因する薬物の併用作用又は負の副作用のせいで減量される。このような化学療法剤のための調製物及び投薬スケジュールは、製造業者の説明書に従うか、又は当業者により経験的に決定されたように用いてもよい。代謝拮抗化学療法剤がゲムシタピンである場合、好ましくは、ゲムシタピンは約600mg/m²から1250mg/m²の間（例えば約1000mg/m²）の用量で、例えば3週間サイクルの1日目及び8日目に投与される。

【0273】

阻害剤及び代謝拮抗化学療法剤の他に、他の治療レジメンをそれに組み合わせてもよい。例えば、第2（第3、第4など）の化学療法剤（単数又は複数）を投与してもよく、本明細書では、第2の化学療法剤は、別の異なる代謝拮抗化学療法剤か、又は代謝拮抗物質ではない化学療法剤かのいずれかである。例えば、第2の化学療法剤は、（パクリタキセル又はドセタキセルなどの）タキサン、カペシタピン、又は白金系化学療法剤（カルボプラチン、シスプラチン、又はオキサリプラチンなど）、アントラサイクリン（リボソームドキシソルピシンを含むドキシソルピシンなど）、トポテカン、ペメトレキセド、ピンカアルカロイド（ビノレルピンなど）、及びTLK286であってもよい。異なる化学療法剤の「カクテル」を投与してもよい。

40

【0274】

阻害剤及び/又は化学療法剤と併用され得るその他の治療剤としては、以下のうち任意

50

の1つ以上が挙げられる：第2の異なるHER阻害剤、HER二量体化阻害剤（例えば、トラスツズマブなどの増殖阻害性HER2抗体、又はHER2過剰発現細胞のアポトーシスを誘発するHER2抗体、例えば、7C2、7F3、又はそのヒト化改変体）；EGFR、HER3、HER4などの異なる腫瘍関連抗原に対する抗体；抗ホルモン化合物、例えばタモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物、又はアロマターゼ阻害剤；心臓保護剤（治療に関連する任意の心筋機能不全を阻止又は低減するための）；サイトカイン；EGFR標的薬（例えば、TARCEVA（登録商標）、IRESSA（登録商標）、又はセツキシマブ）；抗血管形成剤（特にAVASTIN（商標）という商標でGenentechによって販売されているペバシズマブ）；チロシンキナーゼ阻害剤；COX阻害剤（例えばCOX-1阻害剤又はCOX-2阻害剤）；非ステロイド系抗炎症薬であるセレコキシブ（CEL
EBREX（登録商標））；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、Johns
on and Johnsonから入手できるチピファルニブ（Tipifarnib）/ZAR
NESTRA（登録商標）R115777、又はSchering-Ploughから入
手できるロナファルニブ（Lonafarnib）SCH66336）；癌胎児タンパクC
A125と結合する抗体、例えば、オレゴボマブ（Oregovomab）（MoAb B
43.13）；HER2ワクチン（例えば、PharmexiaのHER2 AutoVa
cワクチン、又はDendreonのAPC8024タンパク質ワクチン、又はGSK/
CorixaのHER2ペプチドワクチン）；別のHER標的化療法（例えば、トラスツズ
マブ、セツキシマブ、ABX-EGF、EMD7200、ゲフィチニブ、エルロチニブ、
CP724714、CI1033、GW572016、IMC-11F8、TAK165
など）；Raf阻害剤及び/又はras阻害剤（例えば国際公開第2003/86467号
参照）；ドキソルビシンHClリポソーム注射剤（DOXIL（登録商標））；トポテカンな
どのトポイソメラーゼI阻害剤；タキサン；HER2及びEGFRの二重チロシンキナー
ゼ阻害剤、例えば、ラパチニブ/GW572016；TLK286（TELCYTA（登録
商標））；EMD-7200；悪心を治療する医薬、例えば、セロトニンアンタゴニスト、
ステロイド、又はベンゾジアゼピン；皮疹を予防又は治療する医薬又は標準的な座瘡治療
法（局所又は経口の抗生物質を含む）；下痢を治療又は予防する医薬；アセトアミノフェン
、ジフェンヒドラミン、又はメペリジンなどの解熱薬；造血成長因子など。

10

20

30

40

50

【0275】

同時投与された任意の上記薬剤についての適切な投薬量は、現在用いられている投薬量であり、その薬剤及び阻害剤の組み合わせ作用（相乗作用）に起因してその投薬量を減量してもよい。

【0276】

上記治療レジメン以外に、癌細胞の外科的除去及び/又は放射線療法に患者を供してもよい。

【0277】

上記阻害剤が抗体である場合、好ましくは、投与される抗体は裸の抗体である。しかし、投与される阻害剤を、細胞毒性剤とコンジュゲートしてもよい。好ましくは、その細胞毒性剤が結合しているコンジュゲートされた阻害剤及び/又は抗原は、細胞によって内部移行され、それが結合するガン細胞の殺傷というそのコンジュゲートの治療有効性の増大をもたらす。好ましい実施態様では、細胞毒性剤はガン細胞中の核酸を標的化又は妨害する。このような細胞毒性剤の例としては、メイタンシノイド、カリケアマイシン、リボヌクレアーゼ、及びDNAエンドヌクレアーゼが挙げられる。

【0278】

本出願は、遺伝子療法による阻害剤の投与を考えている。例えば、1996年3月14日に公開された、細胞内抗体を発生させるための遺伝子療法の使用に関する国際公開第96/07321号を参照のこと。

【0279】

（必要に応じてベクターに含まれる）核酸を患者の細胞内にインビボ及びエキソビボで至らせるために、二つの主なアプローチがある。インビボ送達のためには、患者に直接、

通常はその抗体が必要とされる部位に核酸を注射する。エキソビボの処置のためには、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入して、改変された細胞を患者に直接投与するか、又は、例えば多孔性膜内に封入して、その多孔性膜を患者に植込む（例えば米国特許第4892538号及び第5283187号を参照）。生存可能な細胞に核酸を導入するために利用できる様々な技術がある。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで導入されるか、又は意図された宿主の細胞にインビボで導入されるかに応じて変動する。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を導入するのに適した技術としては、リボソームの使用、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などが挙げられる。

【0280】

現在好ましいインビボ核酸導入技術としては、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペス(Herpes simplex)ウイルス、又はアデノ随伴ウイルスなど）及び脂質ベースの系を用いたトランスフェクションが挙げられる（遺伝子の脂質媒介性導入に有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPE、及びDC-Cholである）。ある状況では、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなどのような、標的細胞を標的化する薬剤を核酸の供給源に提供することが所望される。リボソームが採用される場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型に親和性のキャプシドタンパク質又はその断片、循環中に内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、及び細胞内局在を標的化して細胞内半減期を増大するタンパク質を、標的化に、及び/又は取込みを促進するために用いてもよい。レセプター媒介性エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら、J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)；及びWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990)に記載されている。現在周知の遺伝子マーカー作成及び遺伝子治療プロトコルの総説については、Andersonら、Science 256:808-813 (1992)を参照のこと。国際公開第93/25673号及び本明細書に引用した参考文献も参照のこと。

【0281】

VI. 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の治療に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器とラベル又は容器上にある又は容器に付属するパッケージ挿入物を含む。適切な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患又は任意の症状を治療するのに有効な組成物を保持、又は包含し、かつ滅菌アクセスポートを備えてもよい（例えば、この容器は、静脈内溶液バッグであってもよいし、又は皮下注射針によって貫通し得るストッパーを有するバイアルであってもよい）。その組成物中の少なくとも1つの活性剤は、HER3阻害剤、例えば、二重特異性HER3/EGFR阻害剤、例えば、MEHD7945Aである。

【0282】

製造品は、薬学的に許容される希釈バッファー、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第二の容器を更に含んでもよい。製造品には、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及びユーザーの立場から望まれる他の物質の更に含んでもよい。

【0283】

本発明のキット及び製造品はまた、例えば添付文書又はラベルの形で、本組成物が薬剤に応じて定義されたレベルで患者の癌がNRG1を発現する癌を治療するために使用されることを示す情報を含む。挿入物又はラベルは、紙媒体又は磁気記録媒体（例えば、フロッピーディスク）やCD-ROMなどの電子媒体上など任意の形態をとることができる。ラベル又は挿入物はまた、キット又は製造品のキットにおける薬学的組成物及び剤形に関する他の情報を含んでもよい。

【0284】

一般にこのような情報は、含まれる薬学的組成物及び剤形を患者及び医師が効率的かつ

10

20

30

40

50

安全に用いることを容易にする。例えば、HER3阻害剤に関する以下の情報がこの添付文書に盛り込まれてもよい：薬物動態、薬力学、臨床試験、有効性パラメーター、用法用量、禁忌、警告、注意、有害反応、過量、適量及び投与、投与方法、適切な保管条件、参考文献及び特許情報。

【0285】

本発明の特定の実施態様では、二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤を薬学的に受容可能な担体中に含む薬学的組成物と、この阻害剤又は薬学的組成物が、二重特異性HER3/EGFR阻害剤などのHER3阻害剤に応答し得る種類の癌を有する患者を治療することについて指示されることを記載しているラベルとを、一緒に包装して備えている製品が提供され、これはこの患者の癌が、この種類の癌におけるHER3発現について中央値のレベルよりも低いレベルでHER3を発現する。

10

【0286】

本発明のこの局面の任意の実施態様では、本明細書の製品は更に、第二の医薬を含む容器を更に備え、ここでHER3阻害剤が第一の医薬であり、この製品は更に、この第二の医薬を用いて有効量でこの患者を治療するための添付文書上の指示を備える。この第二の医薬は、上記の任意の医薬であってもよく、第二の医薬の例は、別のHER抗体又は化学療法剤である。

【0287】

添付文書は、容器上に記載があるか、又は容器に付随している。適切な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、無菌のアクセスポートを有し得る種類の癌の治療に有効な組成物を保持しているか、又は含みうる（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、HER阻害剤である。ラベル又は添付文書は、組成物が、阻害剤の投与量及び投与間隔並びに提供されている任意の他の薬剤について具体的なガイダンスを用いた治療の対象となる被験者における癌を治療するために使用されることを示す。製造品は、薬学的に許容される希釈バッファー、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液及び/又はデキストロス溶液を含む付加的な容器を更に含んでもよい。製造品には、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及びユーザーの立場から望まれる他の物質を更に含んでもよい。

20

30

【0288】

例えば、本発明に関連する技術領域において利用可能な優れたマニュアル及び教科書の多くに記載されている（例えば、Using Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow, E. 及び Lane, D. による編集、1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (例えば、ISBN 0-87969-544-7) ; Roe B.A. ら、1996, DNA Isolation and Sequencing (Essential Techniques Series), John Wiley & Sons. (例えば、ISBN 0-471-97324-0) ; Methods in Enzymology: Chimeric Genes and Proteins, 2000, 編集、J. Abelson, M. Simon, S. Emr, J. Thorner. Academic Press ; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2001, 第3版, Joseph Sambrook and Peter MacCallum による、(以前のManiatis Cloning manual) (例えば、ISBN 0-87969-577-3) ; Current Protocols in Molecular Biology, 編集Fred M. Ausubel ら、John Wiley & Sons (例えば、ISBN 0-471-50338-X) ; Current Protocols in Protein Science, 編集、John E. Coligan, John Wiley & Sons (例えば、ISBN 0-471-11184-8) 及びMethods in Enzymology: Guide to protein Purification, 1990, Vol. 182, 編集、Deutscher, M.P., Academic Press, Inc. (例えば、ISBN 0-12-213585-7)) か、又は分子生物学における実験法が扱われた多数の大学及び商用のウェブサイトに記載されている、当分野で公知の多数の代替実験法によって、本発明の実施において本明細書に具体的に記載する実験法を首尾良く置き換え得る。

40

【0289】

VII. 広告の方法

本発明は、本明細書において、二重特異性HER3/EGFR阻害剤（例えば、MEDI7945A）などのHER3阻害剤又はその薬学的に受容可能な組成物を宣伝するため

50

の方法であって、ターゲット層(target audience)に対して、(HNSC Cなどの)患者の癌がNRG1を過剰発現する種類の癌患者集団を治療するための阻害剤又はその薬学的組成物の使用の奨励を包含する。

【0290】

広告は一般的にはスポンサーが識別され、メッセージが制御された非個人的な媒体を介する有料の通信である。本明細書における目的のための広告は、広報、広報活動、製品の配置、スポンサーシップ、引受業務、及び販売宣伝を含む。該用語はまた、本明細書の発明を購入し、支援し、又は承認する良好なパターンに向かって、大衆を、説得し、情報提供し、宣伝し、動機付けし、あるいは行動を変更するようにアピールするように計画された、印刷通信媒体の何れかに現れるスポンサー提供の情報公告を含む。

10

【0291】

本明細書中の診断方法の広告や宣伝は、任意の手段によって達成することができる。これらのメッセージを配信するために使用する広告媒体の例としては、放送メディアに現れるメッセージであるコマーシャルを含む、テレビ、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネット、及び看板を含む。広告はまた、食料品のカートの座席上、空港の通路の壁、バスの側面にあるもの、又は電話保留メッセージ、又は店舗内のPAシステムで聞くもの、又は視覚的にも又は聴覚的にも通信が配置されうる任意の場所を含む。

【0292】

プロモーションや広告手段のより具体的な例は、テレビ、ラジオ、映画、ウェブキャスト及びウェビナーなどのインターネット、同時にユーザーに届くように意図されたインタラクティブなコンピュータネットワーク、固定又は電光掲示板、及びその他の公共看板、ポスター、雑誌や新聞などの伝統的又は電子的な文献、他の報道発信地、プレゼンテーション、又は、例えば、電子メール、電話、インスタントメッセージ、郵便、宅配便、大量一斉メール又はキャリアメール、対面での訪問などによる個別の接触を含む。

20

【0293】

使用される広告の種類は、到達されるべきターゲット層、例えば、病院、保険会社、クリニック、医師、看護師、及び患者、並びに、コストの考慮、及び医薬と診断の広告を規制する関連法律及び規制など、多くの要因に依存する。広告は、サービスの相互作用及び/又はユーザーの人口統計及び地理的な場所など他のデータによって定義されたユーザーの特性評価に基づいて、個別化又はカスタマイズされ得る。

30

【0294】

本発明の更なる詳細は、以下の非限定的な実施例により例示される。明細書における全ての引用の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0295】

実施例 1

MEHD7945AはHER3及びEGFRの両方に特異的である。

MEHD7945A(DL11fとしても知られる)は、EGFR及びHER3の両方に対して結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む抗体である。国際公開第2010/108127号及びSchaeferら、Cancer Cell, 20: 472-486 (2011)を参照。典型的には、二重阻害剤は、2つの異なる抗原結合モジュールを連結することによって構築され、各モジュールは、1つの抗原に結合することができる。対照的に、MEHD7945Aにおいては、各モジュール(FAB)が、2つの抗原のいずれかを結合しうするため、親和性効果から高い結合親和性を引き出す可能性を有する。MEHD7945Aの2つの同一のFabのそれぞれが、EGFR又はHER3のいずれかに結合しうることを確認するため、競合的結合アッセイを行った。MEHD7945Aは、固定化されたHER3-ECDへの結合は、EGFR-ECDの量の増加に伴って用量依存的に減少した。MEHD7945Aは、可溶性のHER3-ECDタンパク質によって固定化されたEGFR-ECDから競合させた。予想されたように、それらの相対結合定数を考慮すると、固定化されたHER3-ECDへのMEHD7945Aの結合と競合するためには、より高い濃度の水溶

40

50

性のEGFR-ECDが必要であった(図1)。図1の結果は、ODに対するMEHD7945Aの濃度を表している。アッセイでは、以下に示す水溶性の競合物の存在下で、固定化されたHER3-ECD又はEGFR-ECDへのMEHD7945Aの結合について検討を行なった。1x=0.02µg/ml、10x=0.2µg/ml、100x=2µg/ml、1000x=20µg/ml。図1の結果は、ODに対するMEHD7945Aの濃度を表している。

【0296】

実施例2

MEHD7945AがEGFR及びHER2/HER3依存性シグナルを阻害

細胞シグナル伝達アッセイにおけるMEHD7945Aの二重活性を測定した。HER3における阻害機能を評価するため、NRG治療には強力にHER2/HER3経路を活性化するMCF-7細胞を用いた。NRG刺激の前のMEHD7945Aを用いた治療は、用量依存的に、HER3のリン酸化を強力に阻害し、著しくAKT及びERK1/2のリン酸化を減少させた(図2A)。MEHD7945Aは、IC50が0.05µg/mlのHER3のリン酸化、IC50値が0.19µg/mlのAKTのリン酸化、及びIC50値が1.13µg/mlのERK1/2のリン酸化を阻害した。HER3に対する単一特異性抗体、即ちHER3と同程度の結合親和性を有する抗HERを用いた治療は、同様の結果を達成した。抗HER3は、IC50が0.12µg/mlのHER3のリン酸化、IC50値が0.74µg/mlのAKTのリン酸化、及び、IC50値が1.83µg/mlのERK1/2のリン酸化を阻害した。EGFR-NR6細胞は、リガンド刺激の前にMEHD7945Aで前処理し、MEHD7945AはEGFR、並びにIC50値がそれぞれ0.03及び0.16/m1のERK1/2のリン酸化を阻害したことが解明された(図2B)。単一特異性のEGFR抗体セツキシマブは、EGFR及び下流シグナル伝達分子のリン酸化の阻害において、より効果的であり、それは、EGFRに対する高い結合親和性、更には、ベータセルリン及びアンフィレグリン誘導性のEGFRのリン酸化もまたMEHD7945Aによって阻害されたことが原因である可能性が高い。A431及びBxPC3細胞において、MEHD7945Aは、抗HER3及びセツキシマブとの併用と同等にERK1/2及びAKT経路を強く阻害した。

【0297】

以下のようにアッセイを実施した。指定された濃度のMEHD7945A又は抗HER3で処理したMCF-7細胞を10分間にわたり0.5nMのNRGで刺激した。pHER3(Tyr1289)、pAKTの(Ser473)、pERK1/2(Thr202/Tyr204)、総HER3を検出するため、細胞溶解物をイムノプロットした。図2A. EGFR-NR6細胞を、10分間、5nMのTGF-で刺激する前に、MEHD7945A又はセツキシマブの指定された濃度で1時間処理した。pERK1/2(Thr202/Tyr204)、総EGFR及びリン酸化EGFRを検出するため、細胞溶解物を免疫プロットした。EGFR-NR6細胞のみEGFRを発現するので、EGFRの全ての潜在的なリン酸化部位は、pTyr抗体を用いて検出した。

図2B。

【0298】

実施例3

MEHD7945Aは、多数の癌モデルにおいて活性がある

FaDu異種移植モデル、頭頸部扁平上皮癌モデルにおけるインビボ活性

MEHD7945A、市販の抗EGFR抗体、及び抗HER3抗体について、FaDu細胞(ATCC HTB-43、マナッサス、バージニア州)由来の樹立された腫瘍を有するマウスを用いて試験を行った。5x10⁶のFaDu細胞を、CB17 SCIDマウスに皮下接種した。以下のように同様の大きさの腫瘍を有する動物は、治療コホート(N=9/群)に無作為に分けた。溶媒(MEHD7945Aの製剤緩衝液)、抗EGFR抗体(25mg/kg)、抗HER3抗体(50mg/kg)、及びMEHD7945A(25mg/kg)。治療は、腹腔内投与で、ランダム化を行った日に2倍の負荷用量(そ

10

20

30

40

50

れぞれ50又は100mg/kg)で開始し、合計4回の毎週の治療を継続した。図3に示すように、MEHD7945AはFadu頭頸部癌モデルにおいて活性であり、抗EGFR特異的又は抗HER3特異的な抗体のいずれかよりも、腫瘍増殖の阻害において効果的である。

【0299】

MEHD7945Aは、追加された種類の癌において活性である。

図4は、癌の種類でセツキシマブ又は単一特異性抗HER3抗体の相対活性、及びMEHD7945Aが活性を示す、追加された癌の種類の要約を提供する。この要約を作成するために使用されたアッセイの詳細は、国際公開第2010/108127号に記載されている。簡単に述べると、マウスは、25mg/kgのMEHD7945A、25mg/kgのセツキシマブ、50mg/kgの抗HER3、又は25mg/kgのセツキシマブ+50mg/kgの抗HER3と、週1回4サイクルで処理した。MAXF449、OVXF550及びLX983は、30mg/kgのMEHD7945A、30mg/kgのセツキシマブ、60mg/kgの抗HER3、又は30mg/kgのセツキシマブ+60mg/kgの抗HER3と、週一回4サイクルで処理した。初期投与量は、全ての治療について2倍の負荷用量であった。腫瘍増殖抑制率(TGI)は、大部分のマウスがビヒクル投与群に残っている試験の最終日に基づき、各試験について計算した。25%未満のTGIは「-」、25~50%の間のTGIは「+」、51~75%の間のTGIは「++」、及び76%以上のTGIは「+++」のように示されている。NSCLC=非小細胞肺癌、HNSCC=頭頸部扁平上皮癌、CRC=結腸直腸癌、N/A=該当なし。OVXF550、MAXF449及びLXF983モデルは、ヒト患者に由来する移植モデルである。

【0300】

実施例4

HNSCC腫瘍は、NRG1の二峰性の発現を示す

材料と方法

免疫沈降法及びイムノプロットティング：腫瘍組織の免疫沈降については、腫瘍内容物は(ほとんどのサンプルが>75%の腫瘍組織を有していた)は、50%の腫瘍の最小値を必要とするH&Eによって確認した。腫瘍はドライアイス上で切り刻み、その後、ホスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤(Sigma、P5726-5ML、Roche、13146100)を補充した冷却溶解緩衝液(BioWorld、22040045-2)中で均質化した。25µlの抗HER3抗体(SantaCruz、SC-285-G)及び15µlのDynabeads(Invitrogen、100.07D)を、免疫沈降あたり1~2mgの可溶性タンパク質に加えた。その後、サンプルを4で一晩回転させた。その後、ビーズを磁石を用いて分離し、溶解緩衝液中で3回洗浄した。タンパク質を、95で5分間煮沸することにより、サンプル緩衝液(Invitrogen、NP0007及びNP0009)中に溶出させた。ウェスタンプロットティングは、標準的なプロトコルを用いて行った。溶出したタンパク質の15µlは、サンプルごとに装填し、免疫検出はpHER3(Y1289、#4791)又はpan p-Tyr(クロールPY20、EMD)を用いて行った。

【0301】

組織標本：本試験では、合計で755例の腫瘍標本を使用した。127例のHNSCC(全てのステージ、原発性及び再発性)、117例の手術摘出したNSCLC(ステージI~V)、未治療の転移性疾患の患者からの102例のNSCLC(ステージIII~IV)、フロントラインの標準治療を失敗し続けたが、最終的に2L療法(ステージIII~IV)を受けた患者からの82例のNSCLC、29例の転移性プラチナ難治性卵巣癌、149例の治療経験のない転移性結腸直腸癌、44例の原発性及び転移性黒色腫、及びトリプルネガティブ乳癌(ステージI~IV)の患者からの29件のサンプル。20例の新鮮凍結されたHNSCCの独立したコホートは、NRG1転写物とのIP-ウェスタンにより、蛍光体HER3のレベルを相関させるために用いた。また、再発HNSCC患者

28例(初期診断からの生検及び最初の再発時)のコホートから独立した一連の適合したサンプルが得られた。(これら2つの最後のコホートのいずれも、図5に含めなかった)これらの患者及びその腫瘍の利用可能な病理学的及び人口統計変数をまとめた表を図10及び14に示されている。全てのサンプルはIRB承認とインフォームドコンセントが得られた。

【0302】

核酸に対する組織プロセッシング：RNA抽出組織切片を300lのRLT緩衝液(Qiagen社)に浸漬し、gentle MACS Octo Dissociator(Miltenyi Biotec社)を使用して均質化した。次いで、製造業者の使用説明書に従って、DNAプレップ(DNAeasy、Qiagen社)及びRNAプレップ(Trizol、Invitrogen社)のため、サンプルを半分に分割した。

10

【0303】

Fluidigm 発現分析：遺伝子発現分析は、BioMark 96x96の遺伝子発現プラットフォーム(Fluidigm社)を使用して、細胞株及びホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍サンプルで実施された。腫瘍については、全RNA2µlをcDNAに逆転写し、Superscript III/Platinum Taq(Invitrogen社)、及びPre-amplification reaction mix(Invitrogen社)を使用して、単一反応で事前に増幅した。予備増幅反応は、元のTaqman(Applied Biosystems社)アッセイ濃度の0.05倍での最終希釈で行った。熱サイクル条件は、以下のとおり：50 で15分間の1サイクル、70 で2分間の1サイクル、その後、95 で15秒間の14サイクル及び60 で4分間。

20

【0304】

予備増幅したcDNAは1.94倍に希釈し、その後、メーカーの説明書に従って、BioMark BMK-M-96.96(Fluidigm社)のプラットフォーム上でTaqman Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems社)を用いて増幅した。全てのサンプルは3連でアッセイした。以前に多数の細胞株にわたる発現の安定性について評価した2つのカスタムデザインの参照遺伝子、新鮮凍結組織サンプル、並びにFFPE組織サンプルであるAL-1377271及びVPS-33Bは、発現パネルに含まれていた。2つの基準遺伝子のCt値の平均を、各サンプルについて計算し、NRG1及びHER3の発現レベルは、以下のようにデルタCt(DCT)方法を用いて決定した。平均Ct値(標的遺伝子)-平均Ct値(参照遺伝子)

30

【0305】

AL137727のプライマー/プローブ配列(NM__144568(配列番号：10)；NM__001100814(SEQ配列番号：11)(各配列は、AL137727)のスプライス変異体を表す)は次のとおりである。

フォワードプライマー：GGCCTCAGTACCCTCAGTCT(配列番号：13)

リバースプライマー：AGAGCAGCGGCTGACC(配列番号：14)

FAMプローブ：CCCCACAGGACACAAT(配列番号：15)

40

VPS-33Bのプライマー/プローブ配列(NM__0186689(配列番号12))は以下のとおりである。

フォワードプライマー：GGCTCGAGACCAGCTCATCTA(配列番号：16)

リバースプライマー：GAGATCTGCCTCAATGAATAAATCC(配列番号：17)

FAMプローブ：TGGAGCAGCTTCCT(配列番号：18)

【0306】

NRG1発現の分布の解析及びカットオフの決定：HNSCCにおけるlog₁₀の二峰性分布(NRG1)は、一方は過剰発現がないもの、及びもう一方は過剰発現するもの

50

に対応する、2つの正規分布の混合フィッティングに動機を与える。 x_i は*i*番目のサンプルが、($i = 1, \dots, n$)のために \log_{10} のNRG1発現を示すものとする。混合モデルの尤度は以下のとおり：

$$L(p_k, \theta_k) = \prod_{i=1}^n \sum_{k=1}^2 p_k f_k(x_i; \mu_k, \sigma_k^2)$$

ここで、*k*番目の成分の正規密度関数であり、(μ_k, σ_k^2)は、対応する平均及び分散パラメータを表す。モデルパラメータの最尤推定値は、EMアルゴリズムによって得られた(16)。簡単に説明すると、Eステップは、*i*番目のサンプルが、現在のパラメータ推定値で混合の*k*番目の成分に属する条件付き確率を計算する。Mステップは、現在の確率で混合比、平均及び分散を計算する。プロセスは、その後収束するまで反復される。成分メンバーシップの事後確率は、各サンプルについて計算し、カットオフは、2つの成分の事後確率が等しい値で選択した。モデルフィッティングは、Rパッケージmixtoolsを用いて行った(17)。

【0307】

Dual Color Chromogenic RNA インサイトハイブリダイゼーション：Dual Color Chromogenic RNA インサイトハイブリダイゼーションは、Advanced Cell Diagnostics(フリーモント、カリフォルニア州)により実施された。NRG1プローブセットは、転写物NM_013964のヌクレオチド1082から3001をカバーする31対(計62)のオリゴを有する。ERBB3プローブセットは、本質的に一緒に転写変異体の全てをカバーする2つのプローブセットのプールである。NM_001982のヌクレオチド1962から2945をカバーする20対(計40)のオリゴ。NM_001005915のヌクレオチド108から899までをカバーする14対(計28)のオリゴ。シクロフィリンB(PPIB；陽性)及び細菌遺伝子ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(DapB；陰性)に対して設計されたプローブを対照として使用した。画像は倍率40倍、8ビットのカメラで、Nanozoomerソフトウェアを実行し、Hamamatsu Nanozoomerデジタルスライドスキャナでスキャンした(15, 18)。MathLabの(MathWorks社、ナティック、マサチューセッツ州)のスコアリングアルゴリズムは、以下の工程で構成されている。75%の腫瘍細胞の最小限の関心領域を手動でセクションごとに病理学者によって定義された後、ヘマトキシリン染色は核を識別するために作成され、その後、青色染色(NRG1)、赤色染色(HER3)が適用された。個々の「細胞」は、細胞を明確に分離するため、ヘマトキシリン染色によって明示し、各セルについて青色又は赤色のドット数を表にした。

【0308】

スキャンされた画像は、RGB(赤、緑、青)スペクトルを使用し、Definien Developer(ミュンヘン、AG)を用いて解析した。同一の関心領域は、MATLAB方法と同様に、分析に使用した。領域は約300umの高さ及び幅のタイル状の領域に細分し、最大解像度で分析した。細胞核、NRG1とHER3との間を背景から区別するための基準として色強度(赤、緑、青の強度値のバランス)及びオブジェクトサイズの両方を使用した。スペクトル的に分離することが不可能であった高濃度な重畳核は、バイアスを回避するために、分析から除外した。

両方の方法は、以下の細胞のグループのそれぞれを導出するために使用した。HER3+/NRG+、HER3+/NRG-、HER3-/NRG+、及びHER3-/NRG-オートクリンシグナルは、 $(HER3+/NRG+) / ((HER3+/NRG+) + (HER3+/NRG-) + (HER3-/NRG+) + (HER3-/NRG-))$ のように定義された。

【0309】

HNSCCsは、試験した全ての他の種類の腫瘍に比べて、NRG1が最高の中央値レベルで発現した。また、これらのHNSCCのかなりの部分(約40%)は、他の種類の

10

20

30

40

50

腫よりNRG1が高いレベルで発現した(マンホイットニー検定 $p < 0.0001$; 図6)。更に、NRG1発現は、常用対数目盛でプロットした場合、HNSCCにおいて二峰性の分布を示した。二成分混合ガウス分布は、NRG1の過剰発現とNRG1の過剰発現の欠如との間の変曲点を推定するために使用され、それによって得られた変曲点は、対数目盛で約0.3689であり、線形目盛では約1.50に相当する。この分布に基づく、過剰発現の欠如に対しての過剰発現を定義するための感度及び特異度は、それぞれ90.8%及び93.4%であった。

【0310】

NRG1の高い過剰発現が、活性化HER3を伴ったHNSCCと関連していたかどうかを決定するために、NRG1に対する定量RT-PCR、及び総HER3の免疫沈降に続いて、治療未経験のSCHNN患者からの新鮮凍結腫瘍標本におけるpHER3及びp-チロシンについて、ウェスタンプロットを行った。高NRG1発現(又はその二峰性の分布内の低点付近)を有する全ての腫瘍は、IP-ウェスタンでpHER3に対して陽性であった。逆に、NRG1の発現が最も低かった7件中5件の腫瘍はpHER3(両側符号検定、 $P = 0.0386$)に対して陰性であった。

10

【0311】

更に高いNRG1発現を示す腫瘍を有するHNSCC患者集団を分析するために、腫瘍サンプルは、再発性疾患を有する患者から外科的に切除可能なHNSCC及び腫瘍サンプルを有する患者から得た。NRG1発現は、切除可能な原発性の疾患(図11)と比較して、再発の設定が高かった。これらの結論は、原発巣の部位の違い、HPVの状態、又は他の任意の利用可能な臨床病理学的な情報では説明ができない。

20

【0312】

NRG1発現が、疾患が原発性が再発性により異なる場合があるという結論は、前治療の結果としてNRG1発現の増加を示唆している可能性があるか、もしくは、高NRG1発現がHNSCCの患者における再発の可能性の増大と関連する予後因子であるからである。更にこの疑問を調査するため、該当する患者の原発性及び再発性の一連のサンプルを得て、定量RT-PCRを用いて両コホートでのNRG1発現を比較した。図12; 図13; 図14に示すように)、該当する患者検体における原疾患と比較して、NRG1発現は、再発性の状況が有意に高い(ウィルコクソンの符号順位検定、 $P = 0.002$)。

30

【0313】

最近の報告からの前臨床データでは、HERファミリー受容体を標的とする薬剤への応答を予測するうえで、オートクリン生物学で腫瘍を同定することが重要でありうることを示唆された。(11)HNSCCsにおけるHER3及びNRG1発現のオートクリンに対するパラクリンの発現の程度を決定するため、臨床的に関連するホルマリン固定パラフィン包埋でHER3及びNRG1転写位置並びに存在量を評価するために設計されたdual-color chromogenic RNAインサイツハイブリダイゼーションアッセイを用いた。

【0314】

良性扁平上皮の定性的検査では、NRG1の発現が基底層に限られていたことが示唆され、HER3の発現は正常な重層扁平上皮にのみ局所的に認められた。対照的に、有棘層にのみHER3発現が観察された。類似の発現パターンが多列上気道上皮に認められ、NRG1発現は基底層に限定され、HER3の発現は上皮の上位層に限定されていた。良性組織における単一細胞レベルにおいて、NRG1のソースはなく、ほとんどの細胞及び組織はHER3の比較的一定レベルで発現し、一方では、NRG1の存在下において、遠く離れた細胞でNRG1のソースから増大するHER3発現のグラジエントが存在する。より一般的には、これら2つの転写物のいずれかを発現する細胞の空間的定位置におけるのと同様に、個々の細胞のレベルでHER3及びNRG1の両方の発現の間に逆の関係が存在する。

40

【0315】

幾つかの高分化型の頭頸部扁平上皮癌において、NRG1及びHER3のパラクリン発

50

現の明確な証拠が見出され、正常組織で見られる発現パターンを繰り返している。本明細書で使用される、パラクリン発現は隣接する細胞におけるNRG1又はHER3のいずれかの相互に排他的な発現として定義され、一方、オートクリンは、同一細胞内のNRG1及びHER3の同時発現として定義される。

【0316】

他のより低分化した扁平上皮癌においては、NRG1の基底細胞特異的発現及びHER3の有棘細胞特異的発現との関係は失われており、オートクリンとパラクリンの両方の発現パターンの証拠として、より不規則な構造と矛盾はない。最終的に、HER3/NRG1発現細胞の大部分がオートクリンであるように思われた症例を同定した。

【0317】

高NRG1発現が、オートクリン又はパラクリン発現のいずれと特異的に結合しているかを判断するため、及び、初期治療未経験の標本とそれらに対応する対応治療後の切片との間で認められたNRG1発現の増加が腫瘍由来であったことを確認するために、図12に示された同じサンプル中のNRG1及びHER3について、定量的リアルタイムPCRをRNA-インサイツハイブリダイゼーションと比較した。全体として、NRG1について、量的リアルタイムPCRとRNA-インサイツハイブリダイゼーションとの間に強い有意な正のスピアマン相関が($r = 0.4$ 、 $P = 0.002$)、HER3については、定量的リアルタイムPCR及びRNA-インサイツハイブリダイゼーションとの間に比較的低い、ほぼ有意な正の相関があった($r = 0.2$ 、 $P = 0.051$) (図15A及びB)。

【0318】

3つの異なる定量的な画像処理アルゴリズムは、(上記の本実施例に記載されるように)オートクリン細胞を同定するために使用した。それぞれの方法は、各腫瘍についてのオートクリン成分の相対比率で異なっているが、それらの方法は、MatLabとそれぞれのDefinensに基づいたアプローチとの間で異なった腫瘍について同じように順位付けを行った(スピアマン r :全てのペアごとの組み合わせについて、 $\sim 0.75 - 0.96$ 、全ての場合で、 $P < 0.0001$)。これはアルゴリズムが、潜在的に異なる感度ではあるが、同様の方法でオートクリン及びパラクリンの表現型を区別していたことを示唆している。NRG1発現とは異なり、治療未経験と化学療法後の標本(図13;図14)との間で、オートクリン発現の相対的な寄与度に差はなかった。更に、定量的リアルタイムPCR又はRNA-インサイツハイブリダイゼーションによるNRG1発現のレベルと腫瘍内のNRG1及びHER3のオートクリン発現細胞の割合との関連性は、化学療法前又は化学療法後(スピアマン r は、それぞれ、 0.26 ($P = 0.22$)、 0.03 ($P = 0.91$))で、ほとんどなかった。

【0319】

本データは、HNSCCの相当な部分が、試験した全ての他の種類の腫瘍に比べて、NRG1が有意に高いレベルで発現していることを示している。NRG1発現は、HNSCCにおいて独特の二峰性分布を有し、HNSCC腫瘍の約40%が全ての他の種類の腫瘍よりもNRG1が高いレベルで発現する。この発現のパターンは、HER2陽性の乳癌におけるHER2発現レベルが他の種類の乳癌と比較して少なくとも一桁高く、乳癌におけるHER2発現を想起させる。しかし、乳癌及び胃癌におけるHER2とは異なり、NRG1の過剰発現が遺伝子増幅の関数であるようには考えられない(20, 21)。

【0320】

更に、高NRG1発現は、これらの特定のHNSCC腫瘍において活性化HER3シグナリングを示す可能性のあるpHER3と関連していた。pHER3は、NRG1が発現していたすべての場合において、HNSCC患者の二峰性分布の最下点又はその付近で検出可能であった。ある場合には、pHER3は、NRG1レベルが分布の最下点をいくらか下回っていたサンプルにおいて検出された。二峰性分布の最下点は、複数の独立したデータセットと同様に、潜在的にHNSCC患者の生物学的に異なる集団を反映し、HER3特異治療的介入の恩恵を受ける可能性のあるHNSCC患者を識別するためのカットオ

10

20

30

40

50

フを提供する。

【0321】

重要なことは、2つの最下点のNRG1を発現する腫瘍はまた、検出可能なpHER3を有していた。このことは、HER3のNRG非依存性リン酸化が、c-Metのように、EGFR又は他のRTKとのヘテロ二量体を介して起こり得ることが示されている(1)。HER3のNRG非依存性活性化を示す腫瘍を有する患者は、HER3指向性治療の恩恵を受ける可能性は低いため、予測マーカーとしてNRG1を使用すると、効果的にこの患者集団を除外することに注目することが重要である(12)。

【0322】

更に、該当及び非該当の原発性腫瘍と比較して、NRG1の発現が再発腫瘍標本の方が高い。上述で得られたデータと合わせ、これらの結果は、NRG1の発現がHER3阻害剤への応答とHNSCCの再発についての予後の両方を予測可能であることを示唆している。

【0323】

その結果、NRG1発現レベルはHNSCC患者の統計的及び生物学的に識別可能なサブセットとなる。NRG1の高レベルの発現がHNSCCにおけるHER3の構成的活性化と関連しているため、この重要な癌遺伝子を阻害する薬剤についての実用的なバイオマーカーとなる。

【0324】

実施例5

ニューレグリン1の発現はMEHD7945Aの第I相試験に登録した患者における治療に対する応答を予測する

臨床データの概要

MEHD7945Aは当初、非盲検、多施設、第I相試験(DAF4873g)において、難治性又は再発性上皮性腫瘍患者に静脈内注入で2週間ごと(Q2W)の投与を行なった場合の安全性及び忍容性、薬物動態、薬力学、及び/又は抗腫瘍活性を評価するため、試験が行われていた。本試験は、用量制限毒性(DLT)を評価するため、推奨される第II相用量での複数の拡大コホートの登録と同様に、28日の期間の3+3用量漸増コホートで構成される。

【0325】

本試験に登録した患者が発現した癌種には、HNSCC、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、卵巣癌及び肝/胆管癌が含まれていた。

【0326】

投与用量は、1mg/kgから30mg/kgの範囲で評価した。薬物クリアランスは、用量依存的に減少し、用量10mg/kgで直線性に近づき、MEHD7945Aが、単一特異性抗EGFR抗体で見られるものと同様に標的媒介性クリアランスの影響を受けることを示唆している。2週毎のスケジュールでの1100mgの用量は、患者の95%の異種移植モデルにおいて決定された毎週の有効な曝露を提供することが期待される。

【0327】

MEHD7945Aを2週間毎に14mg/kgで投与された2例のHNSCC患者は、継続した部分応答があり、期間は、10.7及び3.9週間であった。66例中13例の患者は、「安定」の最良効果を経験しており、以前にFOLFIRI+セツキシマブで効果がなかったKRAS野生型転移性大腸癌患者1例を含む3例の患者は4ヶ月間「安定」を維持した。

【0328】

腫瘍関連薬力学的効果は、合計15例の患者で10~30ミリグラム/kgの用量で認められ、うち11例は、以前にEGFR標的療法を受けていた。S6腫瘍、PRAS40、及びERKのリン酸化の減少が、評価可能な組織サンプル17例中6例の患者からの連続生検で認められ、代謝反応(陽電子放射断層撮影法[PET]スキャンによる取り込みでフルオロデオキシグルコース[FDG]の20%減少)は、ベースラインでPET-陽

10

20

30

40

50

性な疾患を有する56例中10例の患者で認められた。これらの変化が観察された腫瘍の種類は、CRC、NSCLC、HNSCC、及び卵巣癌、乳癌、及び肛門癌が含まれている。

【0329】

患者由来のサンプルは、NRG1発現について分析した。

【0330】

上述のとおり、第I相試験では、2例のHNSCC患者は、MEHD7945A二重特異性抗体を用いた治療への部分的な応答を示した。患者1は、2007年に喉頭のHNSCCと診断され、以前の治療として含まれているのは、化学放射線療法、3xセツキシマブ+化学放射線療法で、最良効果が「安定」であった。

10

【0331】

患者1は、MEHD7945A(14mg/kg経静脈投与)で治療後、部分応答が確認された。部分応答は、CT解析に基づく腫瘍の大きさの減少によって、且つ固形癌の治療効果判定のためのガイドライン(RECIST)により規定される適用可能な基準を用いて示された。患者1はまた、臨床的改善(痛みの減少、発声の改善)を示した。1994年に、患者2は舌のHNSCC、最近では肺への転移があると診断された。以前の治療法には、複数回の手術と化学放射線療法が含まれる。患者2は、MEHD7945Aで治療した後(14mg/kgを2週間毎に経静脈投与)、CT解析に基づく腫瘍の大きさの減少により部分応答を示し、且つ、臨床的改善(嚥下能力の回復)があった。

20

【0332】

試験群中のこれら2例の患者に、NRG1が最大値を示した癌が認められた。(図16)更に、再発性HNSCCにおけるNRG1発現レベルは、原発性HNSCCにおけるNRG1発現レベルよりも高いことが決定された。図17は、このアッセイの結果を示し、第I相試験からの患者1のNRG1発現レベルを比較している。

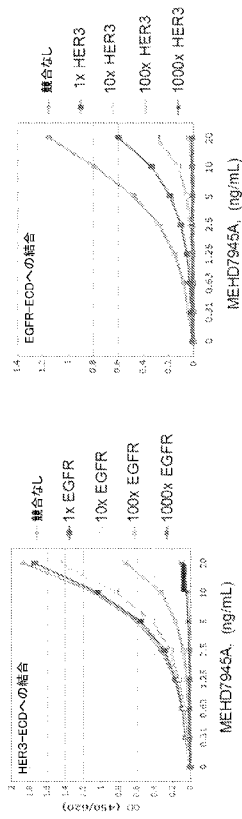
【0333】

参考文献

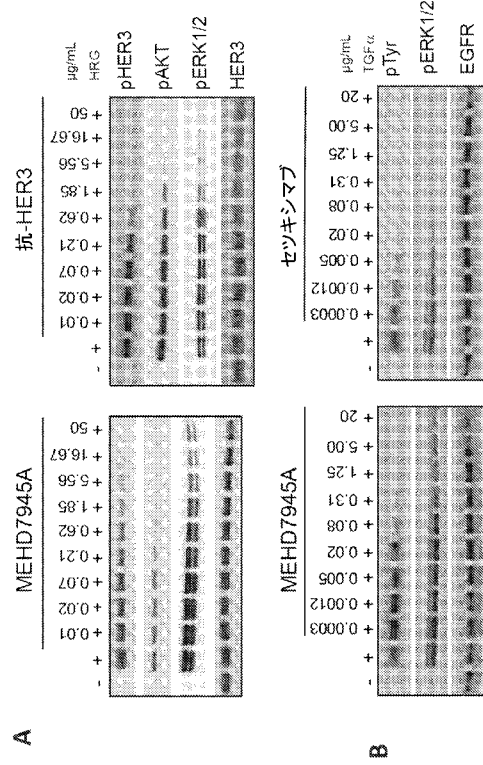
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316:1039-43.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). 2012 [cited; Available from: 30
- Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for HNSCC. *Ann Oncol*. 2005;16 Suppl 6:vi7-vi12.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:9-22.
- Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res*. 2009;315:572-82.
- Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:2666-72. 40
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*. 2006;354:567-78.
- Cohen EEW, Davis DW, Karrison TG, Seiwert TY, Wong SJ, Nattam S, et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *The Lancet Oncology*. 2009;10:247-57.
- Stewart JS, Cohen EE, Licitra L, Van Herpen CM, Khorprasert C, Soulieres D, et al. Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for re 50

- current squamous cell carcinoma of the head and neck [corrected]. *J Clin Oncol*. 2009;27:1864-71.
10. del Campo JM, Hitt R, Sebastian P, Carracedo C, Lokanatha D, Bourhis J, et al. Effects of lapatinib monotherapy: results of a randomised phase II study in therapy-naive patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*. 2011;105:618-27.
11. Wilson TR, Lee DY, Berry L, Shames DS, Settleman J. Neuregulin-1-mediated autocrine signaling underlies sensitivity to HER2 kinase inhibitors in a subset of human cancers. *Cancer Cell*. 2011;20:158-72.
12. Schaefer G, Haber L, Crocker LM, Shia S, Shao L, Dowbenko D, et al. A two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer Cell*. 2011;20:472-86. 10
13. Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*. 1992;256:1205-10.
14. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*. 1994;269:14661-5.
15. Cervantes-Ruiperez A, Juric D, Hidalgo M, Messersmith WA, Blumenschein GR, Baselga J, et al. A phase I study of MEHD7945A (MEHD), a first-in-class HER3/EGFR dual-action antibody, in patients (pts) with refractory/recurrent epithelial tumors: Expansion cohorts. *ASCO Meeting Abstracts*. 2012;30:2568. 20
16. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum Likelihood from Incomplete Data Via EM Algorithm. *J Roy Stat Soc B Met*. 1977;39:1-38.
17. Benaglia T, Chaiveau D, Hunter DR, Young D. mixtools: An R Package for Analyzing Finite Mixture Models. *Journal of Statistical Software*. 2009;32:1-29.
18. Shames DS, Stern H, Walter K, Jiang B, Fu L, Do A, et al. Identification of head and neck cancers (SCCHN) that may respond to dual inhibition of EGFR and HER3 signaling. *ASCO Meeting Abstracts*. 2012;30:5575.
19. Walter K, Holcomb T, Januario T, Du P, Evangelista M, Kartha N, et al. DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:2360-73. 30
20. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011;333:1154-7.
21. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*. 2011;333:1157-60.

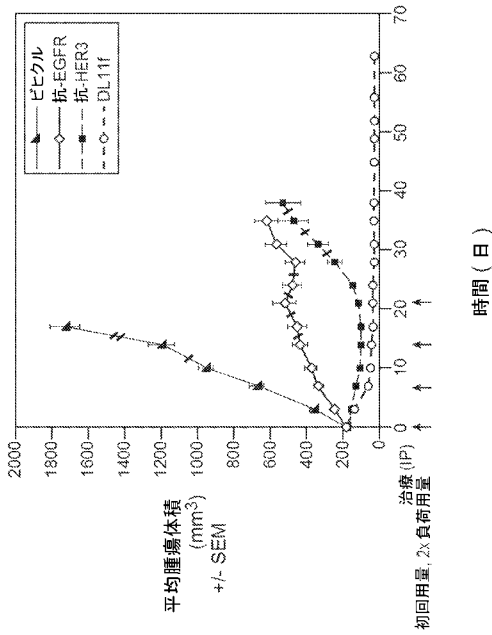
【 図 1 】



【 図 2 】



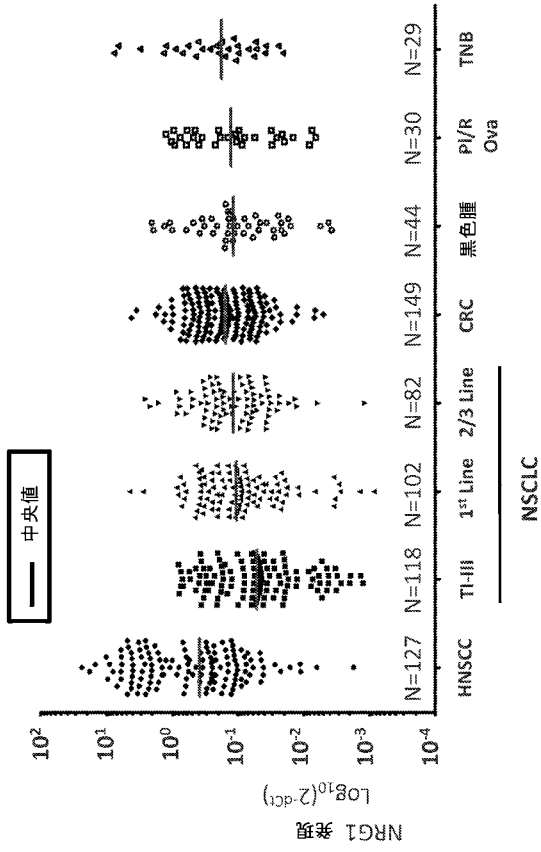
【 図 3 】



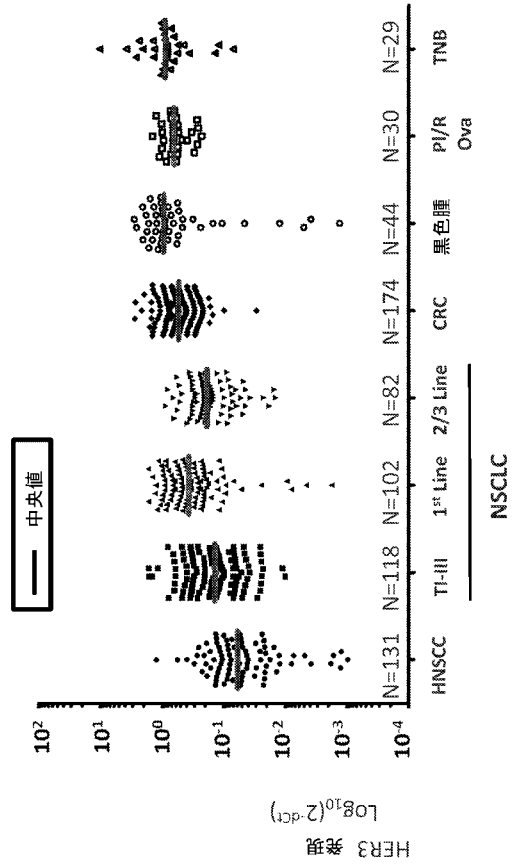
【 図 4 】

モデル	表現型	セツキシマブ	MEHD7945A	抗-HER3	セツキシマブ + 抗-HER3
NCI-H292	NSCLC	+++	+++	-	n/a
NCI-H1975	NSCLC	+++	+++	-	n/a
SW948	CRC	++	++	+	n/a
OVXF550	卵巢	++	++	++	++
A431	類表皮	+++	+++	++	n/a
Cal27	HNSCC	+++	+++	++	n/a
FaDu	HNSCC	++	+++	+++	n/a
LXF983	NSCLC	++	+++	++	+++
MAXF449	乳房	-	+++	+++	+++
A549	NSCLC	-	++	+	+++
Calu-3	NSCLC	-	++	+	++
BxPC3	膵臓	-	++	+	n/a

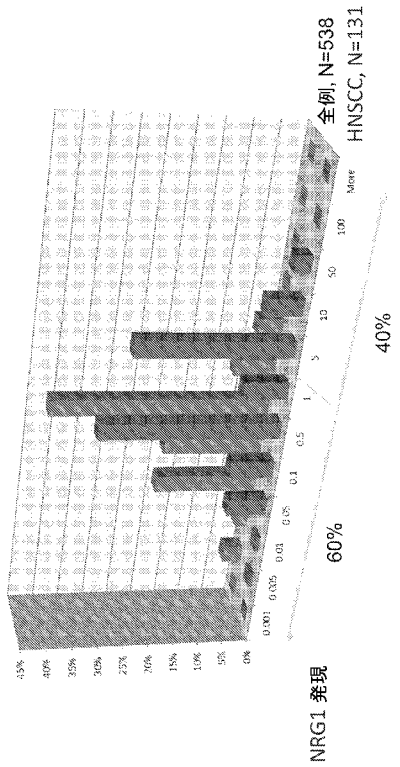
【 図 5 A 】



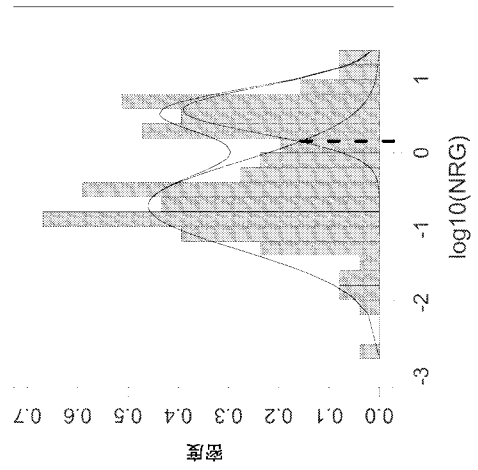
【 図 5 B 】



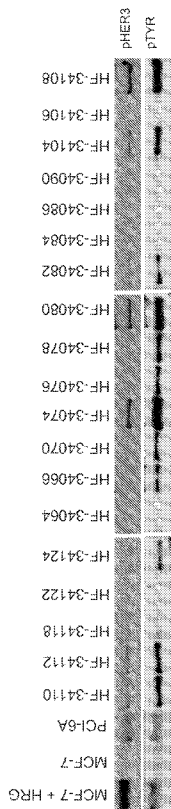
【 図 6 】



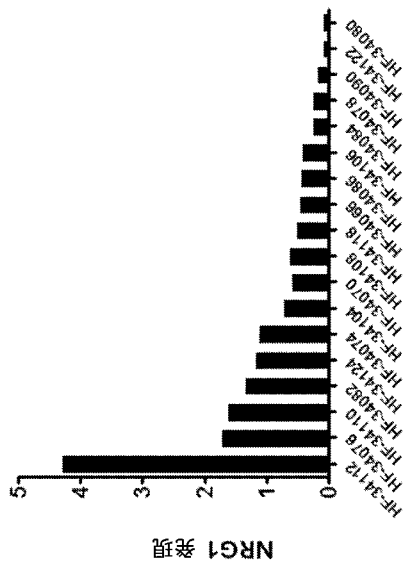
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

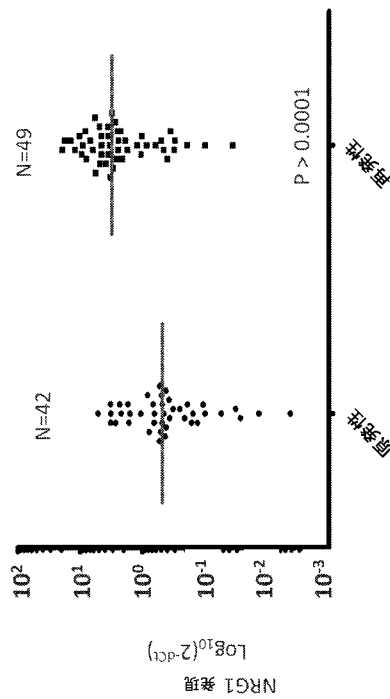


— IP-ウェスタンで陽性

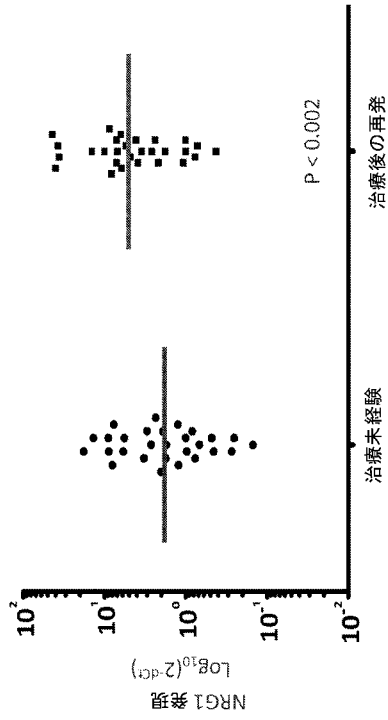
【 図 1 0 】

原発例	%オートクリン		PT ID	NRG1	HER3	%オートクリン
	HERS	MatLab				
原発例 1	0.768	2.055	10720/10	2.381	5.703	10.1%
原発例 2	13.705	3.361	12777/08	4.093	5.829	4.3%
原発例 3	1.769	4.894	13274/10	7.176	6.149	15.0%
原発例 4	8.985	0.621	13699/10	36.133	2.017	10.0%
原発例 5	2.028	11.678	14972/10	3.527	12.438	12.7%
原発例 6	0.455	6.577	15557/10	0.770	6.885	2.1%
原発例 7	3.280	3.074	15706/09	6.320	5.485	5.5%
原発例 8	1.920	4.229	16111/10	3.904	5.505	#N/A
原発例 9	1.741	1.456	17651/09	40.271	6.633	6.9%
原発例 10	1.008	3.094	18742/09	1.801	3.950	#N/A
原発例 11	5.069	5.099	19555/10	6.930	9.085	2.9%
原発例 12	7.715	4.347	20391/09	7.145	7.664	1.8%
原発例 13	0.837	6.161	20896/08	5.441	5.691	14.0%
原発例 14	1.734	0.343	2141/08	2.174	2.398	#N/A
原発例 15	8.883	2.141	21563/08	14.431	3.131	6.6%
原発例 16	18.102	7.724	22612/08	6.186	2.908	1.9%
原発例 17	0.978	7.119	2327/11	1.079	8.241	11.0%
原発例 18	0.252	1.328	2783/11	0.719	4.410	8.0%
原発例 19	0.979	2.534	2851/11	1.016	2.812	17.8%
原発例 20	5.751	3.899	3549/11	44.208	3.283	14.7%
原発例 21	0.149	2.319	6106/10	4.760	5.390	13.9%
原発例 22	0.683	0.030	6310/09	0.426	0.073	0.4%
原発例 23	2.683	2.161	6539/08	1.010	8.169	4.5%
原発例 24	3.010	1.336	6653/10	8.250	2.029	22.1%
原発例 25	0.272	2.395	7824/09	2.620	1.903	#N/A
原発例 26	2.349	11.530	7983/09	37.507	2.387	4.4%
原発例 27	8.014	7.472	9500/10	10.063	5.412	48.3%
原発例 28	1.235	4.954	9856/07	8.718	1.713	11.3%

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

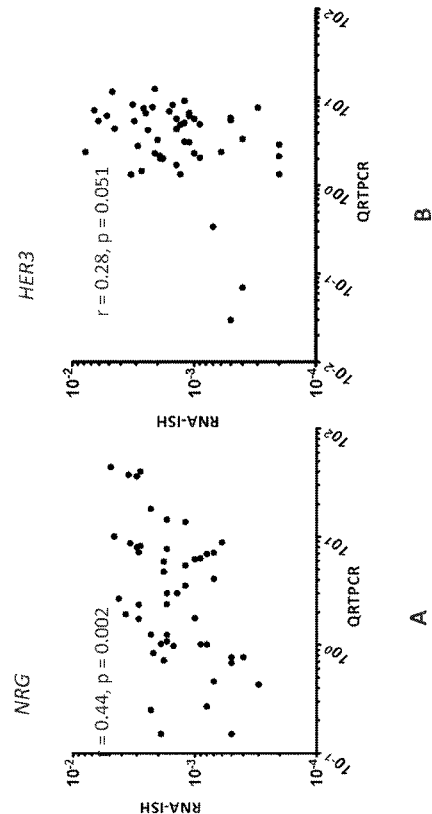
比較	Rx Naïve	Post-Rx	有意差 *
NRG1	3.72 (1.99 - 4.45)	9.61 (4.6 - 14.62)	0.002
HER3	4.07 (2.9 - 4.24)	4.9 (3.84 - 5.96)	0.026
オートクリン (MatLab)	10.65 (7.12 - 14.19)	10.43 (6.62 - 14.59)	NS
オートクリン (Definiens Cells)	38.04 (31.68 - 44.41)	37.4 (30.59 - 44.21)	NS
オートクリン (Definiens Area)	26.89 (21.01 - 32.77)	26.25 (19.65 - 32.85)	NS

* 対応するサンプルについてのウィルコクソンの符号順位検定

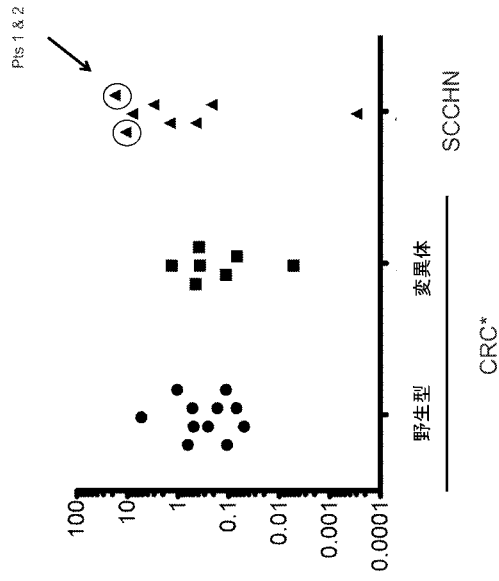
【 図 1 4 】

原発例	% オートクリン			再発例	% オートクリン		
	NRG1	HER3	MatLab		NRG1	HER3	MatLab
Rx Naïve 1	0.76%	0.025%	8.27%	19.20%	19.20%	0.07%	16.93%
Rx Naïve 2	13.25%	3.88%	4.3%	10.3%	11.3%	1.1%	17.9%
Rx Naïve 3	1.76%	0.85%	7.5%	21.8%	21.8%	15.0%	18.9%
Rx Naïve 4	0.85%	0.53%	0.9%	13.7%	13.7%	10.0%	14.0%
Rx Naïve 5	2.3%	1.1%	1.1%	4.0%	4.0%	1.1%	4.0%
Rx Naïve 6	0.45%	0.22%	0.45%	1.0%	1.0%	1.1%	1.0%
Rx Naïve 7	2.80%	1.5%	2.5%	4.0%	4.0%	1.1%	4.0%
Rx Naïve 8	1.30%	1.45%	1.7%	24.0%	24.0%	19.2%	24.0%
Rx Naïve 9	1.5%	1.05%	1.5%	21.5%	21.5%	16.7%	21.5%
Rx Naïve 10	1.05%	1.05%	1.05%	11.0%	11.0%	11.0%	11.0%
Rx Naïve 11	5.00%	3.0%	3.0%	10.0%	10.0%	10.0%	10.0%
Rx Naïve 12	7.75%	4.3%	4.3%	13.0%	13.0%	13.0%	13.0%
Rx Naïve 13	0.37%	0.18%	0.18%	0.37%	0.37%	0.37%	0.37%
Rx Naïve 14	1.35%	0.3%	0.3%	1.35%	1.35%	1.35%	1.35%
Rx Naïve 15	6.8%	3.2%	3.2%	7.8%	7.8%	7.8%	7.8%
Rx Naïve 16	3.2%	1.6%	1.6%	3.2%	3.2%	3.2%	3.2%
Rx Naïve 17	13.0%	7.0%	7.0%	13.0%	13.0%	13.0%	13.0%
Rx Naïve 18	1.0%	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Rx Naïve 19	0.7%	0.35%	0.35%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%
Rx Naïve 20	5.7%	2.85%	2.85%	5.7%	5.7%	5.7%	5.7%
Rx Naïve 21	0.1%	0.05%	0.05%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
Rx Naïve 22	0.6%	0.3%	0.3%	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%
Rx Naïve 23	2.6%	1.3%	1.3%	2.6%	2.6%	2.6%	2.6%
Rx Naïve 24	3.0%	1.5%	1.5%	3.0%	3.0%	3.0%	3.0%
Rx Naïve 25	0.27%	0.135%	0.135%	0.27%	0.27%	0.27%	0.27%
Rx Naïve 26	2.8%	1.4%	1.4%	2.8%	2.8%	2.8%	2.8%
Rx Naïve 27	6.2%	3.1%	3.1%	6.2%	6.2%	6.2%	6.2%
Rx Naïve 28	3.3%	1.65%	1.65%	3.3%	3.3%	3.3%	3.3%

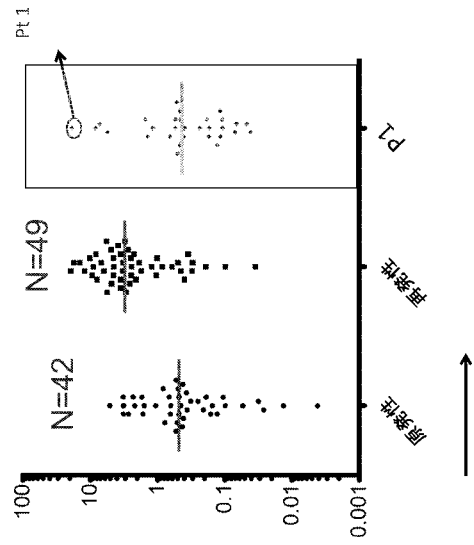
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41
 DL11f E V Q L Y E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S S F T L S G D W I H W V R C A P

 Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 DL11f G K G L E W V G E I S A A G G Y T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L

 Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T V W X Y Z
 DL11f Q M N S L R A E D T A Y Y C A R E S R V S F E A A M D Y W S G G T I V
 配列番号:1

 Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 DL11f D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V I I T C R A S Q N I A T D V A W Y Q

 Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 DL11f Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L O P

 Kabat# 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 DL11f E D F A T Y C C Q S E P E P Y T F G G G T K V E I K R
 配列番号:2

【配列表】

2015514710000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/032076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/108127 A1 (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; SCHAEFER GABRIELE [US]; HABER L) 23 September 2010 (2010-09-23) cited in the application Antibody D1.5-100 corresponds to antibody MEHD7945A of the application; sequences 28,29,48,50,53,54,56,57 page 4, line 29 - page 9, line 26; claims 1-37 page 95, lines 24-33 example 11 ----- -/--	1-22,48
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 August 2013		Date of mailing of the international search report 14/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Page, Michael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/032076

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHAEFER G ET AL: "A Two-in-One Antibody against HER3 and EGFR Has Superior Inhibitory Activity Compared with Monospecific Antibodies", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 20, no. 4, 18 October 2011 (2011-10-18), pages 472-486, XP002694584, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCR.2011.09.003 cited in the application abstract page 474, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1 page 477, right-hand column, paragraph 2 - page 479, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-----</p>	1-22, 48
A	<p>YUKIO YAMANO ET AL: "Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 126, no. 2, 15 January 2010 (2010-01-15), pages 437-449, XP055074058, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.24704 abstract page 442, left-hand column, paragraph 1 - page 447, left-hand column, paragraph 2; table 2</p> <p>-----</p>	1-48
X	<p>TIMOTHYR WILSON ET AL: "Neuregulin-1-Mediated Autocrine Signaling Underlies Sensitivity to HER2 Kinase Inhibitors in a Subset of Human Cancers", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 20, no. 2, 21 July 2011 (2011-07-21), pages 158-172, XP028263270, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCR.2011.07.011 [retrieved on 2011-07-27] abstract page 161, right-hand column, paragraph 2 - page 163, left-hand column, paragraph 3 page 167, right-hand column, paragraph 2 - page 168, left-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-48
A,P	<p>WO 2012/059858 A1 (SYMPHOGEN AS [DK]; PEDERSEN MIKKEL WANDAHL [DK]; JACOBSEN HELLE [DK];) 10 May 2012 (2012-05-10) page 4, line 10 - page 5, line 26</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/032076

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ELLA ATLAS ET AL: "Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo.", MOLECULAR CANCER RESEARCH, vol. 1, no. 3, 1 January 2003 (2003-01-01) , pages 165-175, XP055074300, ISSN: 1541-7786 abstract page 173, left-hand column, paragraph 2 -----</p>	1-22,48
A	<p>MIAW-SHEUE TSAI ET AL: "Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer", ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 22, no. 5, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 761-768, XP002636648, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/SJ.ONC.1206130 [retrieved on 2003-02-06] abstract page 767, right-hand column, paragraph 3 - page 768, left-hand column, paragraph 1 -----</p>	1-22,48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/032076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010108127 A1	23-09-2010	AR 075896 A1	04-05-2011
		AU 2010226453 A1	08-09-2011
		CA 2755640 A1	23-09-2010
		CN 102356092 A	15-02-2012
		CO 6430487 A2	30-04-2012
		EC SP11011338 A	31-10-2011
		EP 2408817 A1	25-01-2012
		JP 2012521196 A	13-09-2012
		KR 20110117256 A	26-10-2011
		MA 33198 B1	02-04-2012
		PE 05392012 A1	12-05-2012
		SG 174378 A1	28-10-2011
		TW 201036637 A	16-10-2010
		US 2010255010 A1	07-10-2010
		US 2012121596 A1	17-05-2012
		WO 2010108127 A1	23-09-2010
WO 2012059858 A1	10-05-2012	AU 2011324870 A1	31-01-2013
		AU 2011324871 A1	09-05-2013
		CA 2816519 A1	10-05-2012
		CA 2816520 A1	10-05-2012
		TW 201231066 A	01-08-2012
		WO 2012059857 A2	10-05-2012
		WO 2012059858 A1	10-05-2012

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 シェイムズ, デーヴィッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 2G045 AA26 BB24 CA25 CB02 CB03 CB08 DA14 DA36 FB03
4B024 AA01 AA12 BA45 BA54 CA04 CA09 CA12 EA04 GA11 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
4C084 AA17 NA05 NA14 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 BB41 BB43 CC02 DD62 DD63 DD88
EE01 GG01
4H045 AA30 BA10 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	HER3抑制剂的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2015514710A	公开(公告)日	2015-05-21
申请号	JP2015503326	申请日	2013-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アムラー、ルーカス シェイムズ、デーヴィッド		
发明人	アムラー、ルーカス シェイムズ、デーヴィッド		
IPC分类号	A61K45/00 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 A61P35/00 A61K39/395 C12Q1/68 C12N15/09 C07K16/30		
CPC分类号	G01N33/6893 A61K2039/505 C07K16/2863 C07K16/32 C07K2317/31 C07K2317/33 C07K2317/55 C07K2317/76		
FI分类号	A61K45/00 G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y A61P35/00 A61K39/395.T C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C07K16/30		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB08 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	61/616241 2012-03-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请描述了使用NRG1过表达作为用HER3抑制剂(例如双特异性HER3/EGFR抑制剂)治疗癌症患者的选择标准,以及治疗这些患者的方法。

